

Aus dem Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionsanalysen
bei Kindern der Multizentrischen Allergie Studie**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

**Philipp Deindl
aus Mannheim**

Dekane:

Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Wahn, Charité Universitätsmedizin Berlin
2. Prof. Dr. Th. Fuchs, Universitätshautklinik, Göttingen
3. Prof. Dr. H. Bickeböller, Zentrum für Informatik, Statistik und Epidemiologie, Göttingen

Datum der Promotion: 18. Januar 2005

Meinen Eltern

Abkürzungen

AD	Atopische Dermatitis
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BHR	bronchiale Hyperreagibilität
bp	Basenpaar(e)
C5	Komplementfaktor 5
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
cM	centiMorgan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GMCSF	Granulozyten-/Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
HLA-DR	humanes Leukozyten Antigen
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase
INF- γ	Interferon-gamma
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
LD	linkage disequilibrium

MHC	Major Histocompatibility Complex
MAS	Multizentrischen Allergie Studie
PAF	platelet activating factor
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PC ₂₀ FEV ₁	Provokationskonzentration mit 20% Abfall der FEV ₁
PCR	polymerase chain reaction
rpm	Rotationen pro Minute
SNP	single nucleotid polymorphism
STRP	short tandem repeat polymorphism
STAT	signal transducer and activator of transcription
TDT	Transmissions Disäquilibrium Test
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UTR	nicht translatierte Region

kursiv gedruckte Abkürzungen bezeichnen jeweils das kodierende Gen des Moleküls.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epidemiologie allergischer Erkrankungen	1
1.2	Genetik	1
1.2.1	Komplexe genetische Merkmale.....	1
1.2.2	Methodik genetischer Untersuchungen	2
1.2.2.1	Zwillingsstudien	2
1.2.2.2	Kopplungsstudien	3
1.2.2.3	„Allele-sharing“ Methoden.....	4
1.2.2.4	Der Transmissions-Disäquilibrium-Test (TDT)	5
1.2.2.5	Assoziationsstudien	6
1.2.3	Genomweite Suchen.....	7
1.2.4	Kopplungsstudien in Kandidatengenregionen	7
1.2.5	Kandidatengenstudien	8
1.2.6	Funktionelle Studien	8
1.3	Immunologie der allergischen Reaktion.....	8
1.3.1	Die Rolle der T-Zellen	8
1.3.1.1	T-Helferzellen vom Typ1 und Typ2 und deren Zytokine	8
1.3.2	Funktionen der Zytokine IL-4 und IL-13.....	9
1.3.3	Der Einfluss von IL-4 und IL-13 auf die IgE-Produktion.....	10
1.3.4	Aufbau und Wirkungen des IL-4- bzw. des IL-13-Rezeptors.....	11
1.3.5	Die Gene <i>IL4</i> , <i>IL13</i> und <i>IL4RA</i>	12
1.3.5.1	Kopplungsstudien	12
1.3.5.2	Kandidatengenstudien.....	13
1.3.6	Der Komplementfaktor C5a und sein Rezeptor C5aR.....	16
1.3.6.1	Biologische Funktion des Komplementfaktors C5a	16
1.3.6.2	Der Rezeptor des Komplementfaktors C5aR	17
1.3.6.3	Hinweise auf immunmodulatorische Funktion des Komplementfaktors C5a	17
1.3.6.4	Bronchiale Hyperreagibilität im Mausmodell und der Komplementfaktor C5	18
1.3.6.5	Zusammenhang zwischen einer C5aR-Variante und Asthma.....	19
1.3.7	Histamin-N-Methyltransferase (HNMT).....	20
1.3.7.1	Biologische Funktion.....	20
1.3.7.2	Funktioneller SNP im HNMT-Gen.....	20
1.4	Allergische Erkrankungen.....	21
1.4.1	Definition von Allergie und Atopie	21

1.4.2	Asthma bronchiale und bronchiale Hyperreagibilität	21
1.4.2.1	Epidemiologie	21
1.4.2.2	Klinik	21
1.4.2.3	Bronchiale Hyperreagibilität.....	22
1.4.2.4	Pathophysiologie	24
1.4.3	Atopische Dermatitis	25
1.4.3.1	Definition	25
1.4.3.2	Epidemiologie	26
1.4.3.3	Klinik	26
1.4.3.4	Pathophysiologie	27
1.4.4	Allergische Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen).....	29
1.4.4.1	Definition	29
1.4.4.2	Epidemiologie	29
1.4.4.3	Klinik	29
1.4.4.4	Pathophysiologie	30
2	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	31
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	Populationen.....	32
3.1.1	Multizentrische Allergie Studie (MAS-90)	32
3.1.2	Barbados-Population	36
3.1.3	Freiburger Asthma-Population	37
3.2	Materialien.....	38
3.2.1	Geräte	38
3.2.2	Verbrauchsmaterialien	39
3.2.3	Reagenzien und Chemikalien.....	40
3.2.4	Puffer und Lösungen.....	40
3.2.5	Enzyme und zugehörige Puffer.....	40
3.2.6	Primer und Sonden	40
3.3	Methoden	41
3.3.1	Gewinnung der Blutproben und Extraktion der genomischen DNA.....	41
3.3.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	41
3.3.3	Verdünnung der Proben.....	41
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	42
3.3.5	Restriktionsenzymatische Spaltung	44
3.3.6	Gelelektrophorese (C5aR)	46

3.3.7	LightCycler	46
3.3.7.1	Aufbau.....	46
3.3.7.2	Sonden.....	46
3.3.8	Statistische Methoden.....	50
3.3.8.1	Der modifizierte TDT für quantitative Merkmale:	52
4	ERGEBNISSE	53
4.1	<i>IL4</i>-, <i>IL13</i>- und <i>IL4RA</i>-SNPs	53
4.1.1	Allel- und Genotypfrequenzen	53
4.1.2	Phänotyp-Genotyp Assoziationen und Haplotypanalysen.....	54
4.1.3	Interaktionstests	58
4.1.3.1	Gen-Gen-Interaktionen	58
4.1.3.2	Gen-Umwelt-Interaktionen.....	59
4.2	Der <i>HNMT</i>-(C314T)-SNP	60
4.3	Der <i>C5aR</i>-(C-245T)-SNP	62
5	DISKUSSION.....	64
5.1	Das Zytokin <i>IL-13</i>.....	65
5.1.1	Die Rolle der <i>IL13</i> -(Arg130Gln)- und <i>IL13</i> -(C-1055T)-SNPs	66
5.2	Der <i>IL4</i>-(C-590T)-SNP	68
5.3	Die Rolle der genetischen Varianten im <i>IL4RA</i>-Gen.....	69
5.3.1	Die <i>IL4RA</i> -(Ser478Pro)- und <i>IL4RA</i> -(Gln551Arg)-SNPs	69
5.3.2	Der <i>IL4RA</i> -(Ile50Val)-SNP	71
5.3.3	Die Assoziation von Atopie mit <i>IL4</i> - und <i>IL4RA</i> -SNPs.....	72
5.4	Die Rolle des <i>C5aR</i>-(C-245T)-SNP	73
5.5	Der <i>HNMT</i>-(C314T)-SNP	74
5.6	Problematik genetischer Studien	75
5.6.1	Umweltfaktoren	75
5.6.2	Phänotyp	75
5.6.3	Ethnizität	75
5.6.4	Kandidatengenstudien	76
5.6.5	Gen-Gen-Interaktionen und Haplotypanalysen	77

6	ZUSAMMENFASSUNG.....	78
----------	-----------------------------	-----------

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie allergischer Erkrankungen

Die Prävalenz von Asthma, atopischer Dermatitis und allergischer Rhinitis ist in den westlichen Industrienationen innerhalb der letzten Jahrzehnte stark angestiegen. Inzwischen sind atopische Erkrankungen dort die häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter geworden. So leiden beispielsweise rund 10% der Jugendlichen unter Asthma. Allein in den USA sind 10-15 Millionen Menschen Asthmatiker. Die direkten und indirekten Gesundheitskosten allein des Asthma bronchiale werden in Deutschland auf 3 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt [1].

Die Pathogenese atopischer Erkrankungen wird von vielen Einflussfaktoren bestimmt. Als umweltbedingte Risikofaktoren, die die Entstehung allergischer Erkrankungen und deren Zunahme erklären könnten, kommen Allergenexposition, Ernährung und mangelnde Exposition mit Infektionserregern in Betracht [2, 3, 4]. Andererseits weisen zahlreiche Studien –insbesondere der Vergleich von mono- und dizygoten Zwillingspaaren– auf eine starke genetische Komponente bei atopischen Erkrankungen hin [5].

1.2 Genetik

1.2.1 Komplexe genetische Merkmale

Asthma und Atopie sind komplexe genetische Merkmale. Charakteristisch für komplexe genetische Merkmale ist, dass diese nicht den klassischen Mendel'schen (rezessiven bzw. dominanten) Erbgängen folgen. Die genetische Analyse komplexer Erbgänge wird durch folgende Grundprobleme erschwert:

Inkomplette Penetranz und Phänokopie: Einige Individuen, die ein Gen erben, das für eine Krankheit prädisponiert, entwickeln diese nicht (*inkomplette Penetranz*), wogegen andere, die dieses prädisponierende Allel nicht erben, aufgrund von Umweltfaktoren trotzdem erkranken (*Phänokopie*). Daher kann der Genotyp an einem bestimmten Locus die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Krankheit beeinflussen, aber nicht vollständig bestimmen. Die Penetranz, also die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung bei einem prädisponierenden Genotyp, kann auch von nichtgenetischen Faktoren wie Alter und Umwelteinflüssen abhängen.

Genetische Heterogenität: Mutationen in unterschiedlichen Genen können identische Phänotypen zur Folge haben, wenn die Gene beispielsweise für einen gängigen biochemischen Stoffwechselweg oder eine häufige zelluläre Struktur kodieren. So können ein und derselben Krankheit verschiedene Gendefekte zu Grunde liegen.

Polygene Vererbung: Mutationen in mehreren verschiedenen Genen müssen gleichzeitig vorliegen/vererbt werden, um die Krankheit auszulösen.

1.2.2 Methodik genetischer Untersuchungen

1.2.2.1 Zwillingsstudien

Zwillingsstudien bieten die Möglichkeit, die genetische Komponente einer Krankheit relativ isoliert von den Umwelteinflüssen zu bewerten. Eineiige Zwillinge sind genetisch identisch und besitzen daher exakt die gleichen Erbanlagen. Zweieiige Zwillinge stimmen in 50 % ihrer Gene überein. Sowohl eineiige als auch zweieiige Zwillinge sind in der Regel den gleichen Umwelteinflüssen und dem gleichen Lebensstil innerhalb ihrer Familie ausgesetzt. Der Vergleich von mono- und dizygoten Zwillingen hinsichtlich komplexer Krankheitsbilder erlaubt daher die genetische Komponente eines

Krankheitsbildes abzuschätzen. Ergebnisse von Zwillingsstudien lassen den Schluss zu, dass eine starke genetische Komponente atopischen Erkrankungen zu Grunde liegt [5]. So schätzt eine Studie mit 11.688 dänischen Zwillingspaaren den Anteil genetischer Faktoren hinsichtlich der Suszeptibilität für Asthma bronchiale auf 73% [6].

1.2.2.2 Kopplungsstudien

Kopplungsstudien dienen der Lokalisation krankheitsverursachender Gene. Hierfür werden sogenannte Mikrosatellitenmarker, STRP (**s**hort **t**andem **r**epeat **p**olymorphisms) eingesetzt (siehe Abb. 1). Diese STRPs enthalten eine unterschiedliche Anzahl von Di-, Tri- oder Tetranukleotid-Wiederholungen. Sie sind in dichter Folge über das gesamte Genom verteilt und ihre Funktion ist bis heute unbekannt.

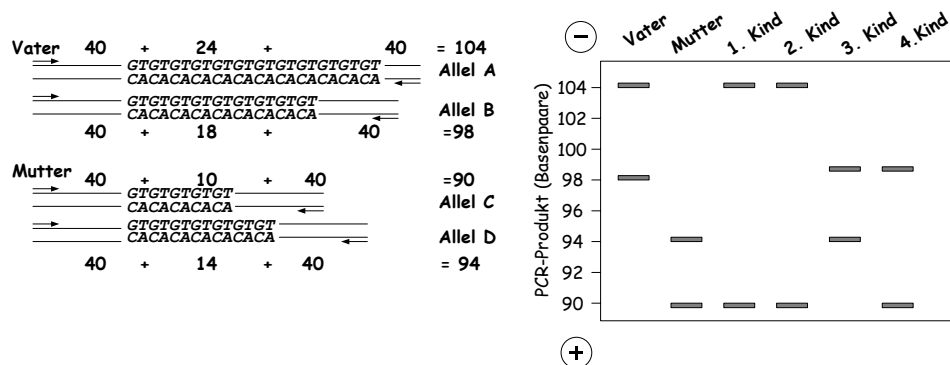


Abb. 1: Links sind schematisch unterschiedlich lange polymorphe Bereiche (STRP) in den Allelen der Eltern dargestellt. Die unterschiedliche Länge der PCR-Produkte kommt ausschließlich durch die polymorphen Dinukleotid-Wiederholungen zustande. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte (rechts) ergeben sich individuelle Bandenmuster. Sind (zahlreiche) betroffene Geschwister (hier z.B. Kind 1 und 2) an diesem Locus genetisch identisch („allele sharing“) spricht dies für eine Kopplung des Markers mit dem entsprechenden Krankheitsgen.

1.2.2.3 „Allele-sharing“ Methoden

„Allele-sharing“-Methoden testen, wie häufig Allele eines genetischen Markers oder eines bestimmten chromosomalen Abschnittes mit verschiedenen genetischen Varianten (Haplotypen) bei betroffenen (kranken) Verwandten gemeinsam auftreten. Sind Verwandte häufiger als es die Zufallsverteilung erwarten ließe für einen polymorphen Marker bzw. einen Haplotyp genetisch identisch, ist dies ein Hinweis darauf, dass dieser Marker mit dem krankheitsverursachenden Gen gekoppelt vererbt wird, d.h. in der Nähe des Markers lokalisiert sein muss. Die Wahrscheinlichkeit einer gekoppelten Vererbung verhält sich umgekehrt proportional zu dem Abstand im Genom. Stimmen zwei Verwandte in einem bestimmten Gen einer chromosomalen Region überein, spricht man von identical-by-descent (IBD), das heißt, genau dieses Gen wurde von einem gemeinsamen Vorfahren vererbt. Ist das krankheitsverursachende Gen nicht bekannt, kann mit genetischen Markern eine chromosomale Region untersucht werden. Dabei kann nur darüber eine Aussage getroffen werden, ob Verwandte in für diesen Marker übereinstimmen, was identical-by-state (IBS) genannt wird. Je dichter die genetischen Marker liegen, desto genauer ist es möglich, von IBS auf IBD zu schließen.

Bei der Untersuchung komplexer genetischer Krankheitsbilder wird meist die „Betroffene-Geschwisterpaar“-Analyse, eingesetzt, die einfachste Form der IBD-Statistik. Geschwister sind zu 50% genetisch identisch, da sie je die Hälfte der Gene von Vater und Mutter erben. Bei der „Betroffene-Geschwisterpaar“-Analyse untersucht man nun Geschwister und analysiert, in welcher chromosomalen Region Paare zu signifikant mehr als 50% genetisch identisch sind. Beide Eltern werden ebenfalls genotypisiert, um einerseits die Vaterschaft zu sichern und um andererseits zu testen, von welchem Elternteil die chromosomalen Abschnitte vererbt wurden. Bei diesem Studientyp kann die Abweichung von der zufälligen Vererbung mit einem einfachen χ^2 -Test ermittelt werden.

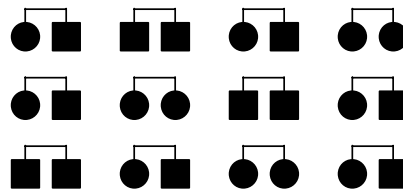


Abb. 2: „**Betroffene Geschwisterpaar**“-Studie: Mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern wird getestet, inwieweit erkrankte Geschwister an bestimmten Genorten genetisch identisch sind (identical-by-descent). Sind dies signifikant mehr als 50% der untersuchten Paare, deutet dies auf eine Kopplung des eingesetzten Markers mit dem Krankheitsbild hin.

1.2.2.4 Der Transmissions-Disäquilibrium-Test (TDT)

Jedes väterliche oder mütterliche Allel wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% an Nachkommen vererbt. Der TDT untersucht, ob signifikante Abweichungen von dieser Verteilung auftreten. Dazu werden betroffene Individuen und beide Eltern (Trios) auf das Vorkommen polymorpher genetischer Marker oder auch **single nucleotide polymorphisms** (SNPs) analysiert. Vererben heterozygote Eltern einen bestimmten Marker/SNP signifikant häufiger als 50% auf kranke Kinder, so weist dies auf eine Kopplung und Assoziation des vermehrt transmittierten Allels mit dem Krankheitsgen bzw. der Erkrankung hin. Positive Ergebnisse bei Anwendung des TDT sind jedoch nur dann zu erwarten, wenn sich der eingesetzte Marker in unmittelbarer Nähe des Krankheitsgens bzw. im Krankheitsgen selbst befindet. Beträgt der Abstand mehr als ein centiMorgan (cM), was etwa 10^6 Basenpaaren entspricht, kann eine Kopplung/Assoziation durch den TDT kaum noch nachgewiesen werden.

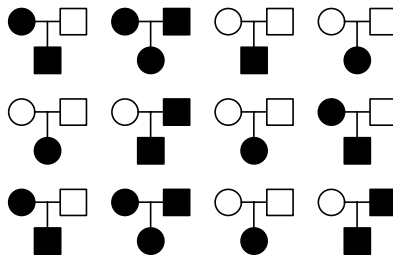


Abb. 3: **Transmissions-Disäquilibrium-Test:** Betroffene Kinder und deren Eltern (unabhängig ob betroffen oder nicht) werden untersucht. Wird ein Allel von heterozygoten Eltern signifikant häufiger als 50% an betroffene Kinder vererbt, deutet dies auf einen Zusammenhang zwischen diesem Marker und der Krankheit hin.

1.2.2.5 Assoziationsstudien

Sind Polymorphismen in einem Kandidatengen bekannt, so können Fall-Kontroll-Studien eingesetzt werden. Dabei werden die Allelfrequenzen in betroffenen versus nicht betroffenen Individuen verglichen. Bei komplexen Krankheitsbildern bedarf es einer sorgfältig ausgewählten Kontrollpopulation, die sich idealerweise nur in dem zu untersuchenden Merkmal von der betroffenen Population unterscheidet.

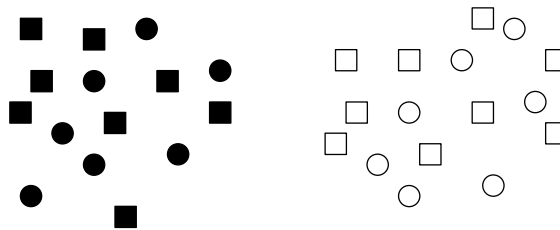


Abb. 4: **Assoziationsstudie:** Betroffene Individuen werden mit nicht betroffenen Individuen verglichen. Dieses Studiendesign bietet sich an, wenn Polymorphismen in Kandidatengen identifiziert wurden und diese auf eine mögliche Assoziation mit der Krankheit getestet werden sollen.

1.2.3 Genomweite Suchen

Ist es unklar, wo sich krankheitsverursachende Gene im Genom befinden, können STRPs in regelmäßigen Abständen über das gesamte Genom verteilt eingesetzt werden. Meist werden betroffene Geschwisterpaare untersucht (siehe auch 1.2.2.3). Chromosomale Regionen, die auf eine Kopplung mit dem untersuchten Krankheitsbild hinweisen, werden anschließend beim sogenannten „fine mapping“ mit enger beieinanderliegenden Markern genauer untersucht. So wird eine Kandidatenregion, die mit der Krankheit in Verbindung stehen könnte, immer enger eingegrenzt (Positionelle Klonierung).

1.2.4 Kopplungsstudien in Kandidatengenregionen

Diese Studien widmen sich gezielt Regionen, in denen Gene lokalisiert sind, die durch ihre biologische Funktion für die Krankheitsentstehung oder -ausprägung von Bedeutung sein könnten. Im Gegensatz zu genomweiten Suchen ist also eine a priori Hypothese erforderlich. Mehrere STRPs werden nach ihrer Lokalisation in diesen Regionen ausgewählt und auf Kopplung (meist in „betroffenen Geschwisterpaaren“ oder mittels TDT) untersucht.

Die Genotypisierung von SNPs in Kandidatengen (siehe 1.2.5) kann ebenfalls für Kopplungsanalysen herangezogen werden, wobei diese biallelischen Marker weit weniger informativ als hochpolymorphe STRPs sind.

Die ständig steigende Zahl chromosomaler Regionen, die in genomweiten Suchen und Analysen von Kandidatengenregionen in Zusammenhang mit atopischen Erkrankungen gebracht werden, verdeutlicht die Komplexität der genetischen Grundlage. Folgende chromosomale Regionen zeigten in *mehreren* Studien einen Hinweis auf Kopplung mit Atopie-assoziierten Phänotypen: 5q23-33, 6q21-23, 11q13, 12q14-24 und 13q11-32 [7].

1.2.5 Kandidatengenstudien

An Kopplungsstudien schließen sich meist Kandidatengenanalysen an, d.h. die Suche nach Varianten der DNA-Sequenz in Genen bzw. deren regulatorischen Elemente. Allelfrequenzen werden dann in Populationen mit definierten Phänotypen analysiert und mit nicht betroffenen Individuen verglichen. Mittels genetischer Varianten lassen sich z.B. bei betroffenen Geschwisterpaaren auch Kopplungsstudien durchführen.

1.2.6 Funktionelle Studien

Da SNPs häufig sind (ca. 1 SNP auf 1000 bp), ist es von Bedeutung, funktionelle Unterschiede einer identifizierten genetischen Variante (zumindest *in vitro*) nachzuweisen.

1.3 Immunologie der allergischen Reaktion

1.3.1 Die Rolle der T-Zellen

Die Entzündungsreaktion bei allergischem Asthma geht einher mit der Einwanderung von hauptsächlich CD4-positiven aktivierten T-Lymphozyten in den Entzündungsort. Sie übernehmen eine zentrale regulatorische Rolle im allergischen Geschehen. Die Aufgabe der T-Zellen besteht in der Unterscheidung zwischen harmlosen und gefährlichen Antigenen. Jede einzelne T-Zelle trägt ihren spezifischen T-Zellrezeptor. Bei allergischen Erkrankungen reagieren die T-Zellen auf harmlose Umweltantigene wie Tierhaare oder Pollen nicht mit Toleranz, sondern einer fehlgeleiteten T-Zellantwort, woraus sich die typische Entzündungsreaktion ergibt.

1.3.1.1 T-Helferzellen vom Typ1 und Typ2 und deren Zytokine

Verschiedene Subpopulationen von T-Zellen, die sich über die von ihnen sezernierten Zytokine definieren, übernehmen unterschiedliche Aufgaben bei der Infektabwehr im Körper. T-Helferzellen vom Typ 2 (TH2) sezernieren

hauptsächlich IL-4, IL-13, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-10, wogegen TH1-Zellen IL-2, INF- γ und TNF- β ausschütten. Die TH1-Zellen vermitteln u.a. eine zelluläre Immunantwort bei der Infektabwehr von Bakterien und Viren. TH2-Zellen sind für die Immunantwort im Rahmen parasitärer Erkrankungen unabdingbar.

Eine ruhende T-Zelle wird durch eine Antigenpräsentierende Zelle (APC), z.B. einen Makrophagen, stimuliert (siehe auch Abb. 9). Erkennt eine APC ein Antigen bzw. Allergen über seine oberflächenständigen Immunglobuline, wird dieses aufgenommen, prozessiert und ein allergenspezifisches Peptid an der Oberfläche der APC über ein **major histokompatibility complex (MHC)**-Molekül der Klasse 2 präsentiert. Zusätzlich schüttet die APC lösliche Botenstoffe aus, die die Polarisierung der naiven T-Zelle in Richtung TH1- oder TH2-Effektorzelle steuern. Die verschiedenen T-Zell-Populationen inhibieren sich gegenseitig. So bewirkt eine aktive TH1-Immunantwort eine Unterdrückung der TH2-Immunität und umgekehrt. Eine TH2-Polarisation am Ort der allergischen Entzündung ist in vielen Studien nachgewiesen worden.

1.3.2 Funktionen der Zytokine IL-4 und IL-13

Bei der TH2-Immunantwort spielen die Interleukine IL-4 und IL-13 auf Grund folgender Funktionen eine tragende Rolle:

- Vermehrte Expression von HLA-DR-Molekülen auf APC (Förderung der Allergenpräsentation) [8];
- Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen;
- Hochregulation der Dichte des niedrigaffinen IgE-Rezeptor (CD23) auf aktivierten B-Lymphozyten. B-Lymphozyten können dann wiederum über ihre Oberflächenimmun-globuline Antigene und Allergene abfangen, internalisieren und auf HLA-DR-Molekülen präsentieren [9];

- Erhalt der TH2-Immunantwort und Unterdrückung der TH1-Immunantwort durch Inhibition der Expression von proinflammatorischen Genen wie *IL1*, *TNF*, *IL6* durch Monozyten-Makrophagen [10];
- Stimulation des Immunglobulin-Klassenwechsels zu IgE-Produktion in B-Zellen [9, 11];
- Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (VCAM-1) [12];
- Produktion von Chemokinen [13].

Aspekte und Wirkungen des Zytokins IL-13 [10]:

- keine intrazelluläre Aktivierung der JAK-3 Kinase;
- keine Förderung der Proliferation von aktivierten T-Zellen;
- keine direkte Wirkung auf T-Zellen;
- Unterdrückung der IL-12 Produktion in Monozyten.

1.3.3 Der Einfluss von IL-4 und IL-13 auf die IgE-Produktion

Neben der Interaktion der Membranmoleküle CD40L bei der aktivierten T-Zelle und CD40 bei der aktivierten B-Zelle, welche den Immunglobulin-Klassenwechsel einleiten [11], ist die Präsenz von IL-4 und IL-13 wesentlich: Beide Zytokine fördern die IgE-Produktion, während IL-12 und Interferon- γ hemmend wirken. Die Dominanz der TH2-Zellen, deren Leitzytokin das IL-4 ist, ist somit ein wichtiges Charakteristikum der Ausbildung einer Reaktion vom Soforttyp.

IL-13 wird ebenfalls von TH2-Zellen gebildet und hat ähnliche Wirkungen wie IL-4, allerdings tragen T-Zellen keinen IL-13 Rezeptor, so dass dieses Zytokin hauptsächlich auf B-Zellen wirkt, wo IL-13 z.B. die IgE-Produktion anregt [9]. Beide Zytokine regulieren die Chemokinproduktion (Eotaxin) ¹³, die Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen sowie die Inhibition von proinflammatorischer Genexpression (IL-1, Tumornekrosefaktor, IL-6) ¹⁰.

Diese Überlappung der Funktionalität von IL-4 und IL-13 kann durch die gemeinsame Nutzung einer Rezeptorkette ihres jeweiligen Rezeptorkomplexes erklärt werden [8].

1.3.4 Aufbau und Wirkungen des IL-4- bzw. des IL-13-Rezeptors

Der IL-4 Rezeptor (IL-4R), der hauptsächlich auf Zellen der Hämatopoiese exprimiert wird, besteht aus einer γ -Kette und einer α -Kette (IL-4R α). Der IL-13 Rezeptor stellt ein Heterodimer aus der gleichen IL-4R α -Kette und einer IL-13R α 1 Kette dar. IL-4 kann an beide Rezeptortypen binden, wogegen IL-13 nur am IL-13 Rezeptor wirken kann. Binden die Zytokine an diese Rezeptoren werden intrazellulär Januskinasen (JAK1 oder JAK3) aktiviert, die wiederum das **signal-transduction-and-transactivation**-(STAT)-Molekül 6 phosphorylieren. Die phosphorylierten STAT6 dimerisieren und binden im Kern der Lymphozyten an spezifische Konsensussequenzen innerhalb der Promoterregionen von Genen, die durch IL-4 und IL-13 reguliert werden. Die gemeinsame Nutzung der IL-4R α -Kette und des IL-13R α 1 Rezeptorkomplexes erklärt viele der ähnlichen Wirkungen dieser Zytokine.

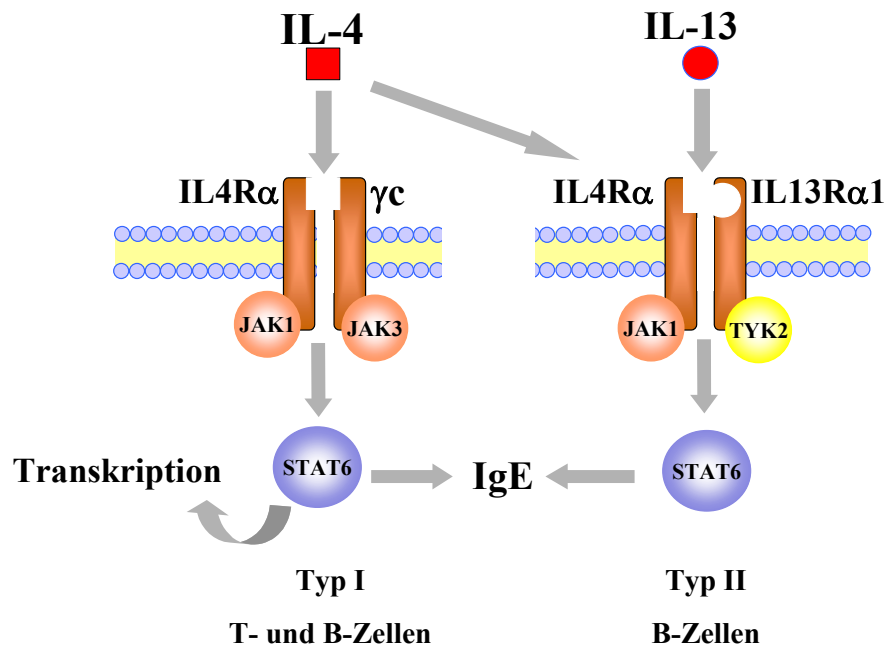


Abb. 5: Schematische Darstellung der IL-4 und IL-13 Signalkaskade über den IL-4 Rezeptor und den IL-13 Rezeptor. IL-4 bindet über die IL-4R α -Kette an beiden Rezeptoren, wogegen IL-13 nur an der IL-13R α 1-Kette wirksam werden kann. Der IL-4 Rezeptor wird auf B- und T-Zellen exprimiert, der IL-13-Rezeptor nur auf B-Zellen. Beide Rezeptortypen aktivieren STAT6, das wiederum T-Helfer-Zellen befähigt, ihre TH2-Eigenschaften zu bewahren und B-Zellen zur Ig-E-Produktion anregt (nach [14]).

1.3.5 Die Gene *IL4*, *IL13* und *IL4RA*

1.3.5.1 Kopplungsstudien

Genomweite Suchen als auch Analysen in Kandidatengenregionen ergaben wiederholt Hinweise auf eine Kopplung von Asthma beziehungsweise Asthma-assoziierten Merkmalen (hohe Gesamt- und spezifische IgE-Konzentration, BHR, Eosinophilen-Konzentration im Blut) mit Chromosom 5q31-33 [15, 16, 17, 18, 19]. Hier sind Gene lokalisiert, die für Zytokine der TH2-Zellen kodieren (siehe Abb. 6). Marsh et al. beschrieben 1994 erstmals eine Kopplung von genetischen Markern auf Chromosom 5q31 mit Gesamt-IgE Werten. Bei den

untersuchten Pennsylvania Amish waren die signifikantesten Ergebnisse für einen Marker innerhalb des *IL4*-Gens zu beobachten. Interessanterweise waren die Kopplungsergebnisse hinsichtlich des Gesamt-IgE bei Nicht-Atopikern dieser homogenen Population am signifikantesten. Dies deutet darauf hin, dass ein Gen bzw. eine genetische Variante in dieser chromosomalen Region die unspezifische („non-cognate“) IgE Regulation moduliert [19]. *IL4* und *IL13* sind auf Grund der unter Absatz 1.3.2 aufgeführten Funktionen interessante Kandidatengene hinsichtlich der Serum-IgE Regulation.

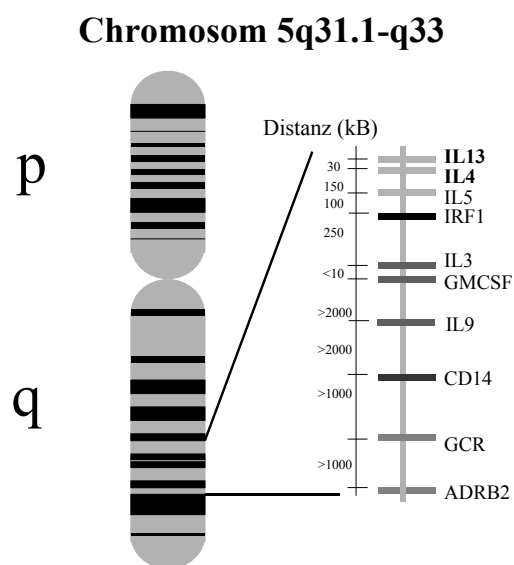


Abb. 6: Schematische Darstellung des Interleukin-Clusters auf Chromosom 5. Der lange Arm wird mit q bezeichnet der kurze mit p. Die Zahlen entsprechen Banden, welche in der Metaphasenfärbung sichtbar sind (nicht maßstabsgetreu wiedergegeben).

Eine Kopplung wurde auch zwischen Atopie und Markern gefunden, die das *IL4RA*-Gen auf Chromosom 16p12 flankieren [20].

1.3.5.2 Kandidatengenstudien

IL4: Fünf genetische Varianten sind im Promotor des *IL4*-Gens bekannt, von denen vier allerdings sehr selten auftreten [20]. Eine Assoziation eines Cytosin zu Tyrosin Austausches an Position –590 mit hohen IgE-Werten wurde von Rosenwasser beschrieben [21], konnte jedoch bisher nicht bestätigt werden.

IL13: Graves et al. identifizierten 7 SNPs im *IL13*-Gen. (siehe Abb. 7). Die Variante in Exon 4 (Arg130Gln) wurde zeitgleich von 2 weiteren Arbeitsgruppen beschrieben [22, 23]. Diese Variante wurde in kaukasischen Populationen mit Gesamt-IgE-Werten [22, 24] sowie Asthma [23] assoziiert. Graves et al. beobachteten, ähnlich wie Marsh et al. zuvor, dass die Assoziation des Exon 4-SNP bei Nicht-Atopikern am signifikantesten war.

Heinzmann et al. zeigten mittels computergestützter molekularer Modellanalysen, dass der Austausch an Position 130 die Konfiguration des Rezeptors an der Ligandenbindungsstelle verändert. Dies impliziert eine Funktionalität des SNP.

Van der Pouw et al. wiesen in einer niederländischen Population eine signifikante Assoziation des *IL13*-C-1055T-Promotor-SNP mit Asthma nach.

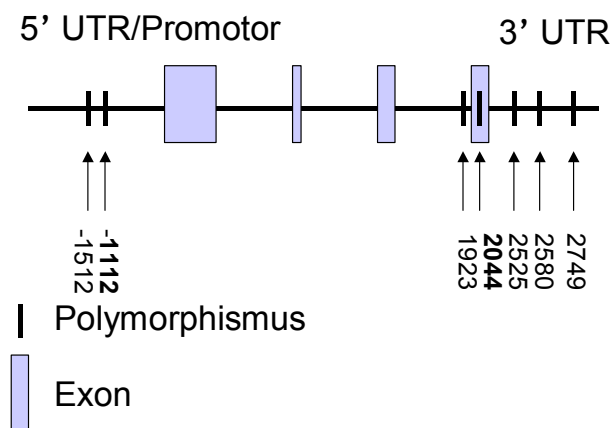


Abb. 7: Schematische Darstellung der Polymorphismen innerhalb des *IL13*-Gens. Der Promotor-SNP an der Position -1112 entspricht C-1055T, der SNP an der Position 2044 resultiert in dem Aminosäureaustausch Arg130Gln (nach Graves et al. 2000).

IL4RA: Insgesamt sind sieben Polymorphismen im *IL4RA*-Gen bekannt, die mit einem Aminosäureaustausch einhergehen. Hershey et al. (1997) beschrieben eine Assoziation des Arg551Gln-Polymorphismus mit Hyper-IgE-Syndrom, atopischer Dermatitis und Atopie [25]. *IL4RA*-Haplotypanalysen in Hutterites identifizierten diesen Genort als Suszeptibilitätsloкус für Asthma [16]. Diese Beobachtungen konnten jedoch bisher nicht bestätigt werden. Mitsuyasu

et al. beschrieben eine signifikante Assoziation zwischen der Ile50 Variante des Rezeptors und Asthma sowie hohen IgE-Werten.

Schwerpunkt dieser Dissertation war die Genotypisierung der o.g. Varianten im *IL4*- *IL13*- und *IL4RA*-Gen in einer großen deutschen Geburtskohorte, um den Effekt dieser Varianten auf das Gesamt-IgE zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen.

Tab. 1: Untersuchte Polymorphismen im *IL4*-, *IL13*- und *IL4RA*-Gen. Die unterschiedliche Nomenklatur der SNPs ist u.a. durch verschiedene Genbank-Referenzen zu erklären. Zur pathophysiologischen Bedeutung dieser Gene siehe auch Abb. 9: Die Darstellung zeigt schematisch den Pathomechanismus atopischer Krankheiten. Abkürzungen: CC16 Clara Cell Protein 16, CD Cluster of Differentiation, FcεR1-β FC-ε Rezeptor 1β (IgE-Rezeptor), GSTP1 Glutathion-S-Transferase 1, HLA Human Leukocyte Antigen, IFN-γ Interferon-γ, IRF-1 Interferon Regulatory Factor 1, 5-LO 5-Lipoxygenase, LT Lymphotoxin, LTC4 Leukotrien C4 Synthase, PAF Platelet Activating Factor, STAT Signal Transducer and Activator of Transcription, TCR T-Zell Rezeptor, TNF Tumor Nekrose Faktor (nach [7]).

Polymorphismen in Kandidatengenen				
Position	Gen	Position		Single Nucleotid Polymorphism
5q31-34	<i>IL4</i>	Promotor	identisch	{ C-590T C-589T
5q31-34	<i>IL13</i>	Exon 4	identisch	{ Gln110Arg Arg130Gln G4257A
		Promotor	identisch	{ C-1055T C-1112T
16p12-p11	<i>IL4RA</i>	Exon 9	identisch	{ S503P Ser478Pro
		Exon 3		Ile50Val
		Exon 9		Gln551Arg

Während *IL4*- und *IL13*-Varianten aufgrund der aufgeführten Funktionen und bisherigen Ergebnisse am ehesten bei der Regulation von Gesamt-IgE eine Rolle spielen, sind andere Gene aufgrund ihrer Funktion und ihres

Expressions-musters eher für allergische Atemwegserkrankungen von Bedeutung. Varianten in zwei Genen, welche eine Suszeptibilität für Asthma oder eine BHR bewirken könnten, wurden zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.3.6 Der Komplementfaktor C5a und sein Rezeptor C5aR

1.3.6.1 Biologische Funktion des Komplementfaktors C5a

Das Komplementsystem umfasst eine Reihe von Plasmaproteinen, die eine Rolle bei Abwehr und Entzündung spielen. Durch Konvertasen wird der Komplementfaktor C5 über den klassischen oder alternativen Weg durch Abtrennen der Alpha-Kette in die Faktoren C5a und C5b zerlegt. Die Reaktionen des Komplementsystems werden in der Regel von Molekülen auf der Oberfläche eines eingedrungenen Mikroorganismus ausgelöst.

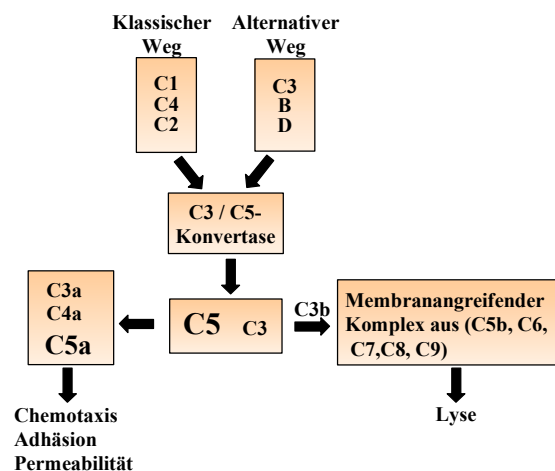


Abb. 8: Schematische Darstellung des klassischen und alternativen Weges der Komplementaktivierung und die Wirkungen der Komplementkomponenten.

Die Faktoren C1 bis C9 sind Glieder des sogenannten klassischen Weges der Komplementaktivierung, die Faktoren B und D bilden die reaktiven Komponenten des alternativen Weges. Der klassische Weg wird ausgelöst durch die Bindung des Faktors C1 an mehrere IgG oder ein pentameres IgM auf der Oberfläche eines Mikroorganismus, der alternative Weg durch Bindung

des Faktors B z.B. an ein bakterielles Lipopolysaccharid (Endotoxin). Das Spaltprodukt C5a ist ein 11kD Glykopeptid, das im Verlauf einiger entzündlicher Prozesse wie bakterieller Sepsis, Trauma, Bildung von Immunkomplexen und akutem „Respiratory-Distress-Syndrom“ entsteht. C5a vermittelt folgende Prozesse [26]:

- Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten,
- Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen,
- Induktion der Degranulation von Phagozyten,
- Erhöhung der vaskulären Permeabilität,
- Kontraktion von glatten Muskelzellen.

1.3.6.2 Der Rezeptor des Komplementfaktors C5aR

Die entzündliche Reaktion des C5 wird durch einen spezifischen Rezeptor (C5aR) vermittelt, der zur Familie der G-Protein gekoppelten 7-Helix-Rezeptoren gehört [27]. C5aR wird von Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen [27, 28, 29], sowie glatten Muskelzellen von Gefäßen und Bronchien exprimiert [30, 31, 32]. Dieses Expressionsmuster unterstreicht die funktionelle Bedeutung von C5aR bei der Immunantwort und im Rahmen von Atemwegsentzündungen.

1.3.6.3 Hinweise auf immunmodulatorische Funktion des Komplementfaktors C5a

C5a induziert die Produktion und Ausschüttung von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und IL-6. Jüngste Studien zeigten, dass Komplementkomponenten eine modulierende Schlüsselverbindung zwischen angeborenen (Komplementsystem) und spezifischen Immunantworten (T-Zell-Antwort) darstellen könnten. Ein Beispiel für diesen Zusammenhang ist die zentrale Rolle, die C3 bei der Unterscheidung zwischen harmlosen und gefährlichen Antigenen spielt [33]. Krug et al.

berichteten über erhöhte Produktion von C5a in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Asthmatikern 24 Stunden nach einer Allergenprovokation [34]. Ein weiterer Hinweis auf die Rolle von Anaphylatoxinen bei allergischen Erkrankungen ist die Beobachtung, dass C5a die IgE vermittelte Histaminausschüttung aus Basophilen bei Patienten mit chronischer Urtikaria verstärkt [35].

1.3.6.4 Bronchiale Hyperreagibilität im Mausmodell und der Komplementfaktor C5

Die Arbeitsgruppe um Karp konnte in einem Mausmodell Komplementfaktor 5 als Risikofaktor für die Ausbildung von allergischem Asthma identifizieren [34]. Weiterhin verglich diese Arbeitsgruppe rekombinante Maus-Stämme mit jeweils hoher bzw. niedriger bronchialer Hyperreagibilität gegenüber Metacholin (C3H/HeJ und A/J) und konnte unterschiedliche Expressionsmuster von C5 in den Lungen nach der Provokation zeigen [36]. Bei Bindung an den C5a-Rezeptor auf Makrophagen wurde eine verminderte IL-12 Produktion festgestellt. Da eine IL-12-Gabe die Ausbildung des experimentellen Asthmas in Mäusen verhindern konnte bzw. dessen Schweregrad verringern konnte, war ein möglicher Mechanismus gefunden, wie der Komplementfaktor C5 die Anfälligkeit für Asthma beeinflusst. Ein SNP im C5 Gen führt zu funktionell verändertem C5, was wiederum eine Dysregulation der IL-12 Produktion (des Leitzytokins der TH1-Immunantwort) bewirkt. Verminderte IL-12 Produktion aber prädisponiert zu einer TH2-Immunantwort, die der allergischen Reaktion zu Grunde liegt.

Die mögliche Rolle von C5 innerhalb des Pathomechanismus von Asthma beim Menschen wird auch durch die Tatsache wahrscheinlich, dass Patienten mit allergischem Asthma eine verringerte IL-12 Produktion sowohl in der Lunge als auch systemisch aufweisen [37, 38].

1.3.6.5 Zusammenhang zwischen einer C5aR-Variante und Asthma

Das Gen, das für C5aR codiert, liegt in der Region 19q13.3-q13.4 [39, 40], einem Genort, der durch Kopplungsstudien mehrfach in Zusammenhang mit Asthma gebracht wurde [41, 42, 43, 44]. Dieses Gen wurde daraufhin von uns mittels Sequenzierung auf SNPs untersucht (Barnes, 2004). *C5aR* besteht aus zwei Exons, die durch ein 1000 bp Intron getrennt liegen. Die Promotorregion liegt rund 300 bp vor dem Exon 1 [39]. In dieser Arbeit wurde ein SNP in der Promotorregion von *C5aR* untersucht (C-245T). Diese Variante wurde als Teil dieser Dissertation in zwei Populationen (MAS- und Barbados-Population) typisiert, um eine mögliche Assoziation mit Asthma bronchiale oder BHR aufzudecken.

1.3.7 Histamin-N-Methyltransferase (HNMT)

1.3.7.1 Biologische Funktion

Histamin ist ein wichtiger präformierter Mediator der allergischen Reaktion. Ausgeschüttet von Mastzellen und Basophilen nach Kreuzvernetzung ihrer oberflächenständigen IgE-Antikörper durch Allergen, wirkt Histamin in der menschlichen Lunge als potenter Bronchokonstriktor (siehe auch Abb. 9). Histamin spielt des Weiteren eine Rolle bei der Regulation der Magensäuresekretion [45] und ist selbst Neurotransmitter im Gehirn [46]. Es existieren zwei Abbauewege für Histamin in unwirksame Metabolite: Die oxidative Deaminierung durch die Diaminoxidase (EC 1.4.3.6) und die N-Methylierung, katalysiert durch das zytosolische Enzym Histamin-N-Methyltransferase (HNMT, EC 2.1.1.8). Die N-Methylierung ist der Hauptstoffwechselweg des Histamins in der Bronchialschleimhaut [47].

1.3.7.2 Funktioneller SNP im HNMT-Gen

Seit einiger Zeit ist eine funktionelle genetische Variante im Exon 4 des *HNMT*-Gens (Chromosom 1p32) bekannt: Der Austausch von Cytosin an Position 314 durch Thymidin führt im translatierten Enzym zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Isoleucin (an der Position 105 des Proteins). Daraus resultiert eine Konformationsänderung, die wiederum eine signifikante Aktivitätsminderung des Enzyms bewirkt [48]. Höhere Histaminkonzentrationen in der Bronchialschleimhaut von Individuen mit diesem SNP könnten daher deren Anfälligkeit für Asthma bzw. das Ausmaß der BHR steigern. Eine Assoziation dieser Variante mit Asthma bronchiale wurde von Yan et al. in einer kaukasischen Kohorte (n=192) beschrieben [49].

1.4 Allergische Erkrankungen

1.4.1 Definition von Allergie und Atopie

Unter Allergie versteht man eine überschießende, krankmachende spezifische Immunantwort (Hyperergie) gegen exogene, in der Regel harmlose Substanzen (Allergene). Bei einem ersten Kontakt mit einem potentiellen Allergen kann es zur Sensibilisierung des Organismus kommen, zunächst jedoch noch nicht zu klinischen Symptomen. Erst bei erneuter Allergenexposition tritt dann die allergische Reaktion auf. Der Begriff Atopie steht für eine vererbte Neigung Typ-I-Allergien gegen Inhalations- und Nahrungsmittelallergene zu entwickeln. Atopie schließt die atopische Dermatitis, die allergische Rhinitis und das Asthma bronchiale ein.

1.4.2 Asthma bronchiale und bronchiale Hyperreagibilität

1.4.2.1 Epidemiologie

Die Prävalenz von Asthma ist, wie die aller allergischen Erkrankungen, in den letzten Jahrzehnten dramatisch gestiegen. Atopische Erkrankungen sind zu den häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter geworden. Bis zu 10% der Jugendlichen und 5% der Erwachsenen entwickeln ein Asthma bronchiale, was ungefähr 7% der bundesdeutschen Bevölkerung entspricht. Rund 6 Millionen Menschen sind in Deutschland und etwa 10-15 Millionen in den USA von der Krankheit betroffen.

1.4.2.2 Klinik

Asthma ist durch die Symptomtrias

- Husten,
- Atemnot und
- pfeifende Atemgeräusche

charakterisiert. Die Ausprägung der Symptome kann von milden saisonalen

Beschwerden mit chronischem Husten oder Giemen bis zu schweren Atemnotzuständen reichen. Gelegentlich kann ein persistierender, meist trockener, oft nächtlicher Husten das einzige Symptom sein. Bei manchen Kindern steht eine Überblähung der Lunge mit vergrößertem Thorax-Tiefendurchmesser und leisem Atemgeräusch (silent lung) im Vordergrund. Die Bronchokonstriktion ist meist reversibel, entweder spontan oder pharmakologisch. Häufig können auslösende Ursachen der Beschwerden identifiziert werden (siehe unter 1.4.2.3). Die bronchiale Hyper- und Dyskrinie führt zu zäh-glasigem Auswurf, der Charcot-Leyden-Kristalle (Proteinaggregate aus eosinophilen Granulozyten) und Curschmann-Spiralen (Bronchialausgüsse aus peripheren Atemwegen) enthalten kann.

1.4.2.3 Bronchiale Hyperreagibilität

Die variable Atemwegsobstruktion bei Asthma bronchiale beruht auf einer Hyperreagibilität der Bronchien. Sie ist definiert als vermehrte Bereitschaft des Bronchialsystems, bereits auf unerschwellige Reize mit einer signifikanten Bronchialobstruktion zu reagieren. Sie kann durch

- allergische Typ-I-Reaktionen,
- bestimmte Mediatoren (Platelet activating factor; PAF),
- Cholinergika, z.B. Metacholin,
- Reizstoffinhalation z.B. Zigarettenrauch, kalte, trockene Luft, Stäube,
- körperliche Aktivität,
- Kältereiz sowie
- bronchiale Infekte

erworben bzw. verstärkt werden und ist in der Regel bei Patienten mit Asthma nachweisbar. Der Schweregrad des Asthma bronchiale wird über das klinische Bild (Anfallshäufigkeit und Ausprägung) sowie durch die Lungenfunktionsanalyse beurteilt.

1.4.2.3.1 Lungenfunktionstests: Unspezifische bronchiale Provokation

Es existieren mehrere Verfahren eine BHR zu testen.

1. Pharmakologische Provokation:

Am häufigsten werden pharmakologische Testverfahren mit Parasympathomimetika wie Acetylcholin, Carbachol oder Metacholin eingesetzt. Alternativ stehen Mediatoren wie Histamin oder PAF sowie hyper- oder hypoosmolare Kochsalzlösungen als unspezifische Reizsubstanzen zur Verfügung. Die Provokationssubstanz wird konsekutiv in steigender Dosis aerosolisiert und vom Patienten inhaliert, bis entweder eine signifikante Bronchialobstruktion anhand des Abfalls der forcierten Einsekundenkapazität um 20% nachgewiesen wird, oder die substanzspezifische Maximaldosis erreicht ist.

2. Physikalische Provokation

Eine weitere Möglichkeit der unspezifischen bronchialen Provokation besteht in der Applikation von Kältereizen oder einer Hyperventilation. Körperliche Belastung auf dem Fahrradergometer oder Laufband werden zum Nachweis einer belastungsinduzierten asthmatischen Reaktion oder BHR genutzt.

Quantifizierung der Bronchialobstruktion

1. Ganzkörperplethysmographie

Bei dieser Untersuchung sitzt der Patient in einer luftdicht verschlossenen Kammer von rund 1m^3 Rauminhalt, so dass seine Atemexkursionen zu Druckschwankungen in der Kammer führen. Gleichzeitig wird der Atemluftstrom durch einen Pneumotachographen gemessen. Dabei atmet der Patient durch ein Rohr mit definiertem Widerstand. Der Druckabfall an diesem Widerstand ist dem Atemluftstrom direkt proportional. Aus Fluss- und Druckänderungen wird ein Druck-Strömungsdiagramm erstellt. Diese Untersuchung erlaubt die Messung des Atemwegswiderstandes bei Ruheatmung.

2. Spirometrie

Bei der Spirometrie wird mit einem Pneumotachograph das nach maximaler Inspiration in der ersten Sekunde bei maximaler Anstrengung ausatembare Volumen bestimmt. Dieser Wert, die sogenannte forcierte Einsekundenkapazität FEV_1 , ist um so geringer, je stärker die Bronchialobstruktion ist. Ein typisches positives Testergebnis beispielsweise einer Histaminprovokation äußert sich als Anstieg des ganzkörperplethysmographisch gemessenen Atemwegswiderstandes und als Abfall des spirometrisch gemessenen FEV_1 . Bestimmt wird meist die Provokationskonzentration, bei der der FEV_1 -Wert um 20% abfällt, $PC_{20}FEV_1$.

1.4.2.4 Pathophysiologie

Die Symptome des allergischen Asthmas gehen auf eine chronische Entzündung der Bronchien mit Zellinfiltrationen, vor allem eosinophiler Granulozyten, Lymphozyten und Mastzellen zurück. Lymphozyten sind an der Induktion dieser Entzündung mit der Sekretion proinflammatorisch wirkender Signalstoffe, sogenannter Zytokine, beteiligt [50]. Mastzellen fördern durch die Sekretion gespeicherter und neu synthetisierter Mediatoren [51] sowie Zytokinen die entzündlichen Veränderungen. Aber auch Makrophagen, Neutrophile, Fibroblasten und Epithelzellen scheinen eine Rolle bei der Pathogenese des Asthma bronchiale zu spielen.

Der Atemfluss wird durch Bronchokonstriktion mit Hypertrophie der glatten Muskulatur [52, 53], submuköse ödematöse Schwellung der Schleimhaut [54], Hypersekretion der endobronchialen Drüsen und einer Viskositätszunahme des Schleims [55] beeinträchtigt. Die akute Bronchokonstriktion beim allergischen Asthma wird durch Ausschüttung von Histamin verursacht nach Kreuzvernetzung von oberflächenständigen IgE-Rezeptoren auf Mastzellen nach Allergenkontakt und folgender Degranulation [56], wie in Abb. 9 schematisch gezeigt.

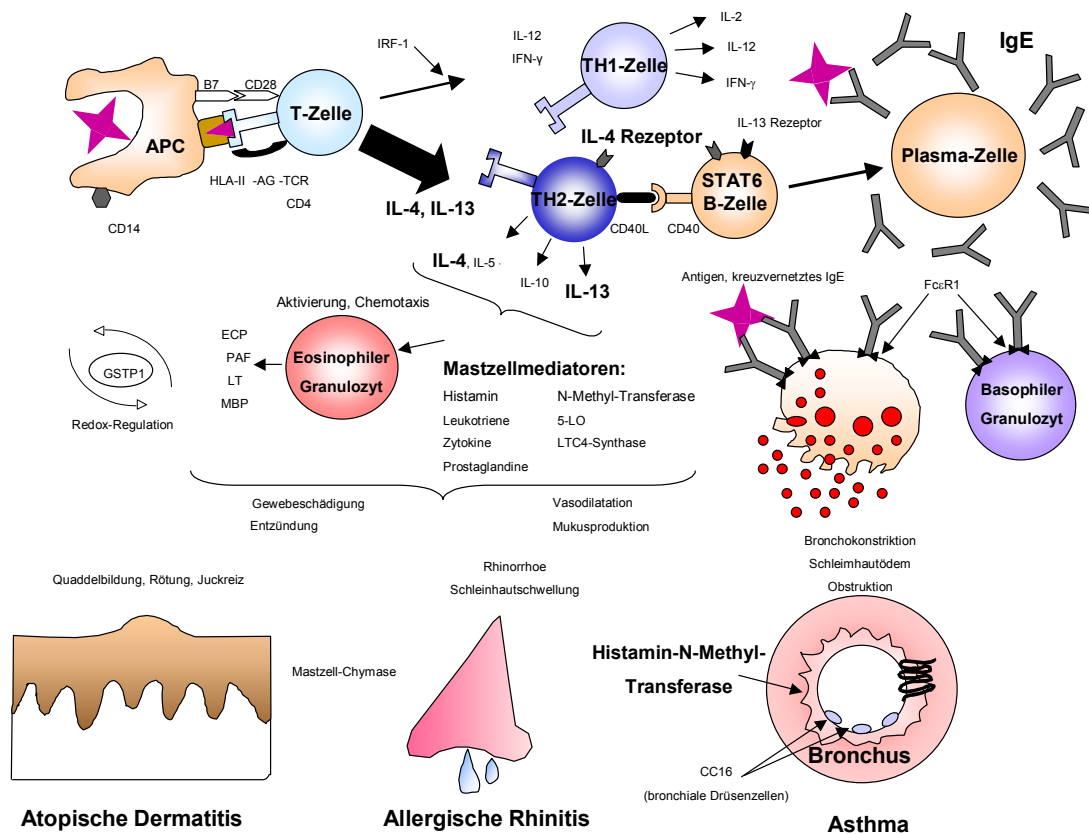


Abb. 9: Die Darstellung zeigt schematisch den Pathomechanismus atopischer Krankheiten. Abkürzungen: CC16 Clara Cell Protein 16, CD Cluster of Differentiation, FcεR1-β FC-ε Rezeptor 1β (IgE-Rezeptor), GSTP1 Glutathion-S-Transferase 1, HLA Human Leukocyte Antigen, IFN-γ Interferon-γ, IRF-1 Interferon Regulatory Factor 1, 5-LO 5-Lipoxygenase, LT Lymphotoxin, LTC4 Leukotrien C4 Synthase, PAF Platelet Activating Factor, STAT Signal Transducer and Activator of Transcription, TCR T-Zell Rezeptor, TNF Tumor Nekrose Faktor (nach [7]).

1.4.3 Atopische Dermatitis

1.4.3.1 Definition

Die atopische Dermatitis (AD), auch atopisches Ekzem, endogenes Ekzem oder Neurodermitis genannt, ist eine chronische bzw. chronisch-rezidivierende, juckende, entzündliche Hauterkrankung. Es sind zwei Typen bekannt: Die extrinsische Form, die 80% der Erkrankten betrifft und mit einer IgE-vermittelten Sensibilisierung einhergeht, und die intrinsische Form, die 20% der Patienten betrifft.

1.4.3.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der atopischen Dermatitis hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen. 8-20% der Kinder unterschiedlicher Bevölkerungsgruppen sind inzwischen von der Krankheit betroffen [57, 58, 59]. So lag die Prävalenz bei einer epidemiologischen Untersuchung an 1000 deutschen Vorschulkindern in verschiedenen Teilen Deutschlands bei 12,9% [60].

Obwohl die atopische Dermatitis in jedem Lebensalter auftreten kann, äußert sich die Krankheit vorwiegend schon im Säuglings- und Kindesalter. 60% der Patienten erkranken im ersten Lebensjahr, 85% bis zum fünften Lebensjahr. Zwillingsstudien konnten eine genetische Disposition für die atopische Dermatitis zeigen. Die Konkordanz von monozygoten Zwillingen ist mit 75% deutlich gegenüber der von dizygoten Zwillingen (25-30%) erhöht [61]. Über 40% der Kinder mit AD entwickeln später Asthma oder eine BHR.

1.4.3.3 Klinik

Kennzeichnend für die atopische Dermatitis sind unscharf begrenzte, meist infiltrierte Erytheme mit Schuppung, Papulovesikeln, nässenden, teils verkrusteten Arealen sowie häufig punkt- und strichförmige Exkoriationen. Bei chronischem Verlauf findet sich eine deutliche Lichenifikation, insbesondere im Bereich der Armbeugen und Kniekehlen. Meist besteht ein quälender Juckreiz. Die Haut der betroffenen Kinder ist meist sehr trocken.

Tab. 2: Klinische Merkmale der atopischen Dermatitis (nach [57]).

Major Kriterien	Minor Kriterien
Juckreiz	atopische Familienanamnese
Gesicht- und Streckseitenekzem bei Säuglingen und Kindern	Hautinfektionen
Beugeekzeme bei Erwachsenen	nicht spezifische Dermatitis der Hände und Füße
chronische oder chronisch-rezidivierende Dermatitis	erhöhte Serum IgE-Werte
	Xerosis
	positive Hautallergietests
	früher Beginn der Erkrankung

1.4.3.4 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der extrinsischen Form der atopischen Dermatitis wird von verschiedenen Faktoren bestimmt:

Immunantwort: Die meisten Patienten zeigen eine Eosinophilie im peripheren Blut und erhöhte Serum-IgE-Werte. Es findet eine Verschiebung der T-Zellantwort zu Zellen, die IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren, statt was den Isotypen-Switch zu IgE fördert, die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 begünstigt und damit die eosinophile Infiltration fördert sowie die TH1-Antwort unterdrückt [57].

Immunpathologie der Haut: Bei akuten ekzematösen Hautläsionen findet sich ein epidermales interzelluläres Ödem mit antigenpräsentierenden Zellen (Langerhans-Zellen, dendritische epidermale Entzündungszellen, Makrophagen), die IgE-Rezeptoren tragen [62] sowie eine starke Infiltration durch aktivierte CD4-T-Zellen. Die Läsionen enthalten ebenso Eosinophile, die wahrscheinlich durch Produktion von reaktiven Radikalen, proinflammatorischen Zytokinen und toxischen Proteinen zur Entzündung und Gewebsverletzung beitragen.

Zytokine: Die nicht betroffene Haut von Patienten mit AD enthält mehr TH2-Zellen, die mRNA für IL-4 und IL-13 produzieren [63]. In der akuten Läsion finden sich nur wenige Zellen, die Interferon- γ oder IL-12 bilden. In chronischen Läsionen dagegen wird verstärkt IL-12, IL-4, GM-CSF, und Interferon- γ gebildet, so dass ein Ablauf der Immunantwort in zwei Phasen diskutiert wird [64]. Aktivierte T-Zellen induzieren ebenso die Apoptose von Keratozyten, was zur spongiösen Umbildung bei der akuten AD führt.

Antigenpräsentierende Zellen: Die IgE-tragenden Langerhanszellen binden und internalisieren Allergene und präsentieren sie T-Zellen. Außerdem wandern sie in die Lymphknoten und stimulieren naive T-Zellen, sich zu TH-2 Zellen zu entwickeln. Die klinische Bedeutung der Langerhanszellen mit hochaffinem IgE-Rezeptor wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich nur in ihrer Anwesenheit bei AD ekzematöse Läsionen durch Applikation von Aeroallergenen provozieren lassen [65].

Infiltration durch Entzündungszellen: IL-16, ein Lockstoff für CD4-Zellen, CC-Chemokine (RANTES), Monocyte Chemotactic Protein 4 (MCP4) und Eotaxin sind bei AD verstärkt ausgeschüttet und führen wahrscheinlich zu der Chemotaxis von Eosinophilen und TH2-Lymphozyten in der Haut. Ebenso induzieren mechanische Traumen die Ausschüttung von TNF- α und vieler anderer proinflammatorischer Zytokine durch Keratozyten [66].

1.4.4 Allergische Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen)

1.4.4.1 Definition

Die allergische Rhinitis ist eine heterogene Störung, die in der Folge einer allergischen Entzündung der oberen Atemwege nach einer Allergenexposition entsteht und trotz hoher Prävalenz oft nicht diagnostiziert wird.

1.4.4.2 Epidemiologie

Die Prävalenzen in unterschiedlichen Ländern variieren von 3% bis zu 30% [67]⁵⁸. Man schätzt, dass etwa 20-40 Millionen US-Amerikaner an der Krankheit leiden [68]. Die Häufigkeit der allergischen Rhinitis hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Eine Studie in einer pädiatrischen Population ermittelte bei 6-Jährigen eine Prävalenz von 42% [69]. Eine finnische Studie konnte eine Verdreifachung der Prävalenz von 1977 bis 1991 zeigen [70].

1.4.4.3 Klinik

Die allergische Rhinitis ist charakterisiert durch ein oder mehrere der folgenden Symptome:

- Niesen,
- verstopfte Nase,
- Pruritus und
- Rhinorrhoe.

Diese Symptome sind oft mit einer allergischen Reaktion der Augen kombiniert, die mit konjunktivaler Injektion, Ödem, Tränenfluss und Juckreiz reagieren. Man unterscheidet eine saisonale Form während des Pollenflugs, den Heuschnupfen, und eine Dauerform, die mindestens während neun Monaten des Jahres auftritt. Die allergische Rhinitis ist mit vielen Komorbiditäten

assoziiert wie Sinusitis, Otitis media und Asthma [67].

1.4.4.4 Pathophysiologie

Morphologisch handelt es sich um eine allergische Entzündung der Nasenschleimhaut, die durch eine IgE-vermittelte Sofortreaktion auf körperfremde Proteine ausgelöst wird. Als Auslöser der saisonalen allergischen Rhinitis stehen vor allem Pollenallergene von Erle, Hasel, Birke, Gräsern, Roggen, Beifuss und Wegerich im Vordergrund.

Auch bei der allergischen Rhinokonjunktivitis bestimmt die Tendenz zu TH2-Immunantworten mit Expression von IL-4, IL-13 und IL-5 die Pathophysiologie der Erkrankung. Die Mastzelldegranulation setzt Substanzen wie Histamin, Tryptase, Chymase, Kininogenase, Heparin und andere Enzyme frei. Des Weiteren werden proinflammatorische Substanzen wie Prostaglandin D2 und Leukotriene frei, die die Gefäßpermeabilität erhöhen und die wässrige nasale Hypersekretion verursachen. Diese Mediatoren stimulieren zusätzlich sensible Nervenfasern, was zu Juckreiz führt, die Nasenatmung durch Schwellung behindert und den Niesreflex auslöst (siehe auch Abb. 9).

2 Fragestellung und Zielsetzung

IL4, *IL13* und *IL-4RA* spielen eine zentrale Rolle bei der allergischen Reaktion und Regulation der IgE-Produktion. In diesen Genen sind mehrere funktionelle SNPs beschrieben.

Welche der SNPs bzw. welche Haplotypen sind bei der Regulation der IgE-Produktion bei deutschen Kindern relevant?

Existieren Gen-Gen Interaktionen?

Lassen sich Gen-Umwelt-Interaktionen beobachten?

Ein funktioneller *HNMT*-(C314T)-Polymorphismus bewirkt eine Funktionsminderung des histaminabbauenden Enzyms.

Findet sich eine Assoziation des SNP mit Asthma bzw. BHR bei deutschen Kindern?

Beeinflusst diese Variante das Ausmaß der BHR bei asthmatischen Kindern?

Im Mausmodell wurde *C5* als Suszeptibilitätsloкус für Asthma identifiziert und scheint eine Schlüsselverbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darzustellen. Andere Gruppen fanden eine Kopplung zwischen dem Genort des *C5a*-Rezeptors und Asthma.

Findet sich eine Assoziation des *C5aR*-(C-245T)-Polymorphismus mit Asthma oder Asthma-assoziierten Phänotypen bei deutschen Kindern und/oder bei einer afro-karibischen Studienpopulation?

3 Material und Methoden

3.1 Populationen

3.1.1 Multizentrische Allergie Studie (MAS-90)

Die deutsche Multizentrische Allergiestudie (MAS-90) wurde initiiert, um den Voraussagewert verschiedener klinischer und immunologischer Parameter sowie den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entwicklung von atopischen Krankheiten in früher Kindheit zu untersuchen.

Fünf deutsche Städte (Berlin, Düsseldorf, Freiburg, Mainz und München) waren das Einzugsgebiet für die Rekrutierung von Neugeborenen für diese prospektive Studie. 1314 von 7609 Neugeborenen, die im Zeitraum zwischen dem 1.1.1990 und dem 31.12.1990 geboren wurden, wurden in die Geburtskohorte aufgenommen. 499 Kinder (38%) wurden als Patienten mit einem hohen Risiko für Atopie eingestuft. Sie hatten mindestens zwei atopische Familienmitglieder und/oder wiesen eine IgE-Konzentration im Nabelschnurblut größer als 0,9 kU/l auf. Die Kinder der Kontrollgruppe (815 Kinder = 62%) wurden unter den verbliebenen Neugeborenen zufällig ausgewählt. Sie hatten entweder einen oder keinen Atopiker in der nahen Verwandtschaft und einen Nabelschnurblut-IgE-Wert kleiner als 0,9 kU/l. Eltern wurden als Atopiker definiert, wenn sie über eines der folgenden Symptome beziehungsweise eine der folgenden Krankheiten berichteten: Atopisches Ekzem, allergische Rhinitis, Asthma, Nahrungsmittelunverträglichkeit, Pollen-, Hausstaubmilben-, Katzenhaar-, Hundehaar- oder Schimmelpilzallergie.

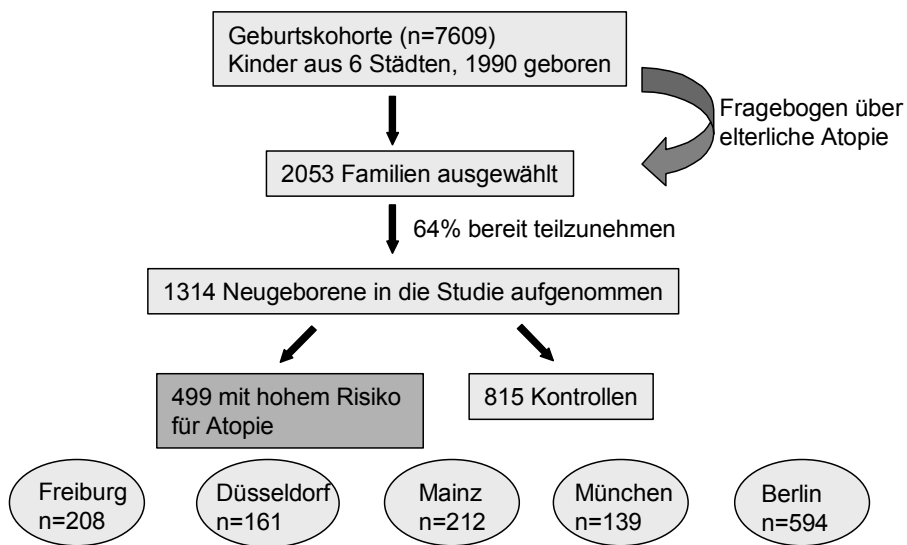


Abb. 10: Studiendesign und Auswahl der Neugeborenen in der Multizentrischen Allergie Studie.

Die Kinder der Kohorte kamen regelmäßig mit ihren Eltern zu Nachuntersuchungen jeweils im Lebensalter von einem Monat, drei Monaten, sechs Monaten, 12 Monaten, 18 Monaten, 24 Monaten und anschließend einmal jährlich. Die Untersuchungen beinhalteten:

Fragebogen und Interview: Die Eltern füllten einen Fragenkatalog aus und antworteten auf gezielte Fragen zu Atopie-spezifischen Symptomen und Erkrankungen seit der letzten Untersuchung. Außerdem wurden Fragen zur Ernährung, Entwicklung des Kindes, zu Umweltfaktoren (Zigarettenrauch, Haustiere), zur häuslichen Situation und zu psychologischen Problemen gestellt. Die MAS-Fragebögen und Interviews wurden auf der Grundlage der ISAAC (International Study on Asthma and Atopy in Childhood)-Fragebögen entwickelt [71].

Körperliche Untersuchung: Bei jedem Termin wurde eine standardisierte körperliche Untersuchung durchgeführt. Dabei war ein Schwerpunkt die standardisierte Dokumentation von Hautläsionen.

Blutentnahme: Im Serum der Kinder wurden im Alter von 1, 2, 3, 5, 7 und 10 Jahren Gesamt-IgE- und spezifische IgE-Antikörperkonzentrationen gegen neun gängige Nahrungsmittel- und Inhalationallergene bestimmt. Die spezifischen IgE-Antikörper gegen Hühnerei, Kuhmilch, Sojabohnen, Weizen, Hausstaubmilben, Katzenhaare, Gräsergemisch und Birkenpollen wurden mit einem Radioallergosorbent Fluorescence Immunoassay (CAP-RAST-FEIA, Pharmacia and Upjohn, Freiburg) bestimmt. Die IgE-Werte wurden für die statistischen Analysen log-transformiert, um eine Gauss'sche Verteilung zu erreichen.

Aus EDTA-Blut wurde die genomische DNA extrahiert. Insgesamt steht die genomische DNA von 888 Kindern sowie 1231 Eltern zur Verfügung. Insgesamt ergaben sich 382 komplette Trios (Mutter, Vater, Kind).

Lungenfunktionsuntersuchung: Lungenfunktionstests bei den Kindern wurden an allen deutschen Zentren mit dem gleichen Ganzkörperplethysmographen (Master-Lab, E Jäger, Würzburg) durchgeführt. Bestimmt wurden das forcierte expiratorische Volumen der ersten Sekunde (FEV_1) und die forcierte Vitalkapazität (FVC).

Ein pharmakologischer Provokationstest wurde mit Histamin-dihydrochlorid in aufsteigenden Dosen durchgeführt. Die Ausgangsdosis betrug 0,125 g/l Histamindihydrochlorid, anschließend wurden immer höhere Dosen (0,5 g/l; 2,0 g/l; 8,0 g/l) verabreicht, bis der Patient dies nicht mehr tolerierte oder die FEV_1 um mehr als 20% absank. Die Histaminkonzentration, die einen Abfall der FEV_1 von 20% bewirkte ($PC_{20}FEV_1$), wurde durch lineare Interpolation der beiden letzten Messwerte berechnet. Wurde schon nach der Anfangskonzentration ein Abfall von mindestens 20% verzeichnet, wie es bei 5% der Studienteilnehmer der Fall war, so wurde der Nullwert als erster Datenpunkt verwendet. Wenn die Maximaldosis von 8,0 g/l nicht ausreichte, um einen 20% Abfall zu bewirken, wurde diese Dosis für die Berechnung verwendet.

Staubanalysen: Teppichstaubproben der häuslichen Umgebung wurden im Alter von 6 und 18 Monaten, 3 Jahren, 4 Jahren, 5 Jahren auf die wichtigsten Innenraumallergene überprüft: Hausstaubmilben, Katzen- und Hundehaar.

Alter	Klinische Daten Fragebogen, Interview, körperl. Unters.	Staub Milben Katze Hund	Serum Gesamt IgE Spez. IgE	Andere Unters.
1 Monat	+			
3 Monate	+			
6 Monate	+	+		
12 Monate	+		+	
18 Monate	+	+		
2 Jahre	+		+	
3 Jahre	+	+	+	
4 Jahre	+	+		
5 Jahre	+	+	+	Pricktest
6 Jahre	+		+	
7 Jahre	+		+	Lungenfunktionstest Histaminprovokation

Abb. 11: Untersuchungen von Geburt bis zum siebten Lebensjahr bei den Kindern der MAS-Kohorte.

Bei der Untersuchung am siebten Geburtstag (\pm sechs Wochen), nahmen noch 939 (71,5%) der Kinder teil. Die Phänotypen der allergischen Erkrankungen wurden wie folgt definiert:

Als **Asthmatiker** galt ein Kind bei mindestens zwei aufgetretenen Episoden von pfeifender Atmung mit Luftnot.

Das **atopische Ekzem** wurde bei einer Kombination von mindestens drei typischen Hautveränderungen an drei typischen Körperstellen diagnostiziert.

Allergische Rhinitis im Alter von 7 Jahren wurde definiert als Auftreten von

Niesattacken und/oder einer laufenden, verstopften, juckenden Nase ohne Erkältung während der letzten 12 Monate. Zusätzlich mussten spezifische IgE-Antikörper ($\geq 0,7$ kU/l) gegen Gras- und/oder Birken-Pollen vorliegen.

Ein Kind galt als **sensibilisiert**, wenn der spezifische IgE-Wert bei mindestens einem von neun Hauptallergenen (Milbe, Hund, Katze, Kuhmilch, Ei, Soja, Weizen, Birke, Gras) $\geq 0,7$ kU/l betrug.

Mütterliches Rauchen wurde als **Tabakrauchexposition** des Kindes gewertet, da Mutter und Kind sich normalerweise in enger räumlicher Nähe zueinander befinden. Pränatale Exposition wurde als mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft definiert und von postnataler Exposition ausgegangen, wenn die Mutter bei ≥ 2 der ersten drei Nachfolgetermine angab zu rauchen oder zu ≥ 4 Zeitpunkten der insgesamt 7 Untersuchungen. Uneindeutige Angaben wurden als fehlend definiert.

3.1.2 Barbados-Population

K. Barnes rekrutierte zwischen 1993 bis 2002 783 Individuen auf Barbados (Karibische Inseln). Die Population setzt sich aus Asthmatikern und deren unmittelbaren Verwandten zusammen. 13-20% der gesamten Bevölkerung von Barbados leiden unter Asthma. Der Anteil an Atopikern wird noch höher geschätzt. Barnes und andere haben bei der Bevölkerung von Barbados eine extrem hohe mittlere Gesamt-IgE-Konzentration gefunden, die die hohe Allergenexposition in dieser tropischen Umgebung widerspiegelt. Das Hauptallergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* beispielsweise liegt mit $60 \mu\text{g/g}$ Hausstaub [72] rund 30 mal höher als die „Risikokonzentration“ in den USA bzw. Europa [73]. Die exzessive Exposition erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass genetisch prädisponierte Individuen atopische Erkrankungen ausbilden. Es gibt keine parasitären Erkrankungen auf Barbados, die die hohen IgE-Werte erklären könnten. 7% der Barbados Population rauchen, unter den Asthmatikern sind nur 5% Raucher. Alle Kernfamilien wurden über einen Asthma-Probanden ausgewählt. Die Asthmatiker wurden systematisch aus der Notaufnahme des Queen Elizabeth

Hospitals oder aus Arztpraxen auf der Basis von folgenden Einschlusskriterien ausgewählt: Erstens sollten sie älter als sechs Jahre alt sein, zweitens sollte eine ärztliche Diagnose Asthma gestellt worden sein und drittens sollten beide Elternteile verfügbar sein oder bei einem fehlenden Elternteil verfügbare Geschwister, um den fehlenden Genotyp abzuleiten. Es wurden alle Kernfamilienmitglieder eingeschlossen und wenn möglich, der Stammbaum so weit wie möglich ausgedehnt.

3.1.3 Freiburger Asthma-Population

250 Kinder mit Verdacht auf Asthma im Alter von 5 bis 18 Jahren (Mittelwert=10,8 Jahre) aus dem Einzugsgebiet von Freiburg wurden in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Freiburg untersucht. Es wurde eine standardisierte Untersuchung durchgeführt, die Fragebögen zu klinischen Symptomen und Medikation, die Bestimmung von totalem und spezifischem IgE, Pricktests, Lungenfunktionstests, bronchiale Histaminprovokationen sowie die Bestimmung des belastungsabhängigen Abfalls des FEV₁-Wertes mittels Laufbandbelastung beinhaltete. Die Teilnehmer wurden angewiesen, frühzeitig die Asthma- bzw. Allergiemedikation vor der Untersuchung abzusetzen. Die Probanden wurden mit Pricktests durch intrakutane Gaben von 17 häufigen Allergenen (Hausstaubmilben, verschiedene Gräser- und Baumpollen, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, Hund, Katze, Hase, Ente und Pferd) zusammen mit Positiv- (Histamin) und Negativkontrollen getestet. Der Durchmesser der resultierenden Schwellung wurde nach 15 Minuten bestimmt. Der Pricktest wurde als positiv gewertet, wenn die Schwellung mindestens halb so groß wie die der Positivkontrolle war.

Spezifische IgE-Antikörperkonzentrationen wurden mit einem enzymgekoppelten Immunosorbent Assay gegen zwei Mischungen von Gräserpollen, Milbenallergenen (*Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae*), Katze, Hund, Haselnuss, und Birkenpollen bestimmt (Magic Lite, Chiron Diagnostics, Fernwald). Ein Test galt bei $\geq 1,43$ ML

Units als positiv. Die Gesamt-IgE-Konzentration wurde mit Hilfe eines Enzym Allergosorbent Test (Phadezym, Pharmacia, Uppsala, Schweden) gemessen.

Die Lungenfunktion und Histaminprovokation wurden nach einem dem der MAS-Studie vergleichbaren Standardprotokoll durchgeführt. Um belastungsinduzierte FEV₁-Abfälle zu evaluieren, wurden die Probanden 6 Minuten lang standardisiert körperlich belastet (Laufband). Die erste spirometrische Messung und Peak flow-Bestimmung wurden 2-3 Minuten und die zweite Messung 5-6 Minuten nach der Belastung durchgeführt.

Die Diagnose eines Asthma bronchiale stützte sich auf asthmatische Symptome, den Gebrauch von antiasthmatischen Medikamenten sowie einer nachgewiesenen BHR (Histaminprovokation und/oder Laufbandbelastung).

3.2 Materialien

3.2.1 Geräte

Wasserbad	GFL 1086, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifugen	Varifuge RF, Heraeus Sepatech, HanauCentrifuge 5415D, Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf Multipette plus, Eppendorf AG, Hamburg 3,5ml Transferpipette, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Eppendorf Research Pipetten 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl, Eppendorf AG, Hamburg Multichannel Finnpiquette 5-50µl, Thermo Labsystems, Egelsbach Finnpiquette 40-200µl Thermo Labsystems, Egelsbach
Photometer	Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Maschinen	Tpersonal, Biometra GmbH, Göttingen T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen
Vacuumzentrifuge	Speedvac SVC100, Savant, Framingdale, NY, U.S.A
Vortexer	Minishaker MS1, IKA-Works Inc., Wilmington, NC, U.S.A.
Waage	Mettler PE3000, Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz
Mikrowellenherd	MW-715m 1200W, Clatronic GmbH, Kempen

Magnetrührer	Ikamag Ret, IKA-Labortechnik, Staufen
Gelkammern	Sub-Cell GT Mini / Wide Gel Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA
Spannungsquelle	PowerPac 300, Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA
UV-Transilluminator	TI 1, Biometra GmbH, Göttingen
Drucker	Digital Grafic Printer UP-D860E, Sony Corp., Tokio, Japan
Digitale	MWG Biotech, Ann Arbor, MI, U.S.A
Sofortbildkamera	
LightCycler	LightCycler II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Kapillarzentrifuge	LC Carousel Centrifuge, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Software	Version 3.5, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PC	Vectra, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn
Drucker	Deskjet 970CXI, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn
Bildschirm	P1110, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Blutabnahmeröhrchen	EDTA Monovetten, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
DNA-Extraktionskit	QIAamp DNA Midi Kit, Qiagen GmbH, Hilden
Konische	Falcon 15ml u. 50ml, Becton Dickinson Labware, Meylan Cedex, Frankreich
Polystyrolröhrchen	
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Microcentrifuge Tubes 1,5ml, Eppendorf AG, Hamburg Qiagen Collection Tubes 15ml, Qiagen GmbH, Hilden Tubes 4ml 75x11,5mm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Combitips plus 2,5ml u. 10ml, Eppendorf AG, Hamburg Eurotips in Racks 100µl u. 1000µl, Eppendorf AG, Hamburg 10µ, 100µl, 1000µl, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
UV-Küvetten	Kuvette 220-1600nm, Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten	96-well Format, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Handschuhe	SatinPlus Exam Gloves, Safeskin GmbH, Neufahrn Nitrile Exam Gloves, Safeskin GmbH, Neufahrn
PCR-Reaktionsgefäße	PCR Tubes ultradünn 0,2ml Strips a 8 Tubes u. Caps, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf PCR Softstrips 0,2ml Strips a 8 Tubes u. Caps, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf Multiply-Pro Cap 0,2ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Parafilm	American National Can, Menasha, WI, U.S.A
Mikrotiterplatte	Nunc, Roskilde, Dänemark
LightCycler Kapillaren	Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.2.3 Reagenzien und Chemikalien

Ethanol, absolut (100%)	Merck KgaA, Darmstadt
Steriles Wasser	Aqua ad injectabile, Braun, Melsungen
Agarose	Agarose Ultrapure, GibcoBRL, Paisley, Schottland
PCR-Öl	Bayol F, Serva, Heidelberg

3.2.4 Puffer und Lösungen

TBE-Puffer	10x Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH8,3 Merck KgaA, Darmstadt
Probenauftragspuffer	10x DNA-Probenpuffer: 200mM EDTA (pH8,2), Sigma, Steinheim 50 Vol.% Glycerin C ₃ H ₈ O ₃ (87%), Carl-Roth GmbH, Karlsruhe 0,25% Bromphenolblau, Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe 0,25% Xylencyanol FF, Sigma Chemical Inc., Steinheim
Ethidiumbromid 1%	Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe

3.2.5 Enzyme und zugehörige Puffer

Taq-Polymerase	5U/μl, AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Roche, Mannheim
PCR-Puffer	10x PCR buffer (+15mM MgCl ₂), Applied Biosystems, Roche, Mannheim
dNTPs	dNTPs, je 2,5mM, Applied Biosystems, Roche, Mannheim
DNA-Leiter	100bp DNA-ladder, 0,1 μg/μl, Invitrogene GmbH, Karlsruhe
BPU1102 (CellII)	10u/μl, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England
BPU-Puffer	20mM Tris-HCl (pH8,2), 10mM MgCl ₂ , 60mM NaCl, 1mM DTT, 0,1% BSA, Amersham, Pharmacia, Buckinghamshire, England

3.2.6 Primer und Sonden

PCR-Primer	10μM, TIBMOLBIOL, Berlin
Sonden	5μM, TIBMOLBIOL, Berlin

3.3 Methoden

3.3.1 Gewinnung der Blutproben und Extraktion der genomischen DNA

Die durch Venenpunktion gewonnenen Blutproben wurden in EDTA-Röhrchen abgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Extraktion der genomischen DNA aus Vollblut wurde der QIAamp DNA Midi Kit von QIAGEN nach dem Arbeitsprotokoll des Herstellers verwendet: 2 ml EDTA-Blut wurden in ein Reagenzröhrchen überführt, mit 200 μl QIAGEN Proteaselösung und 3 ml Puffer AL gründlich gemischt und für 20 Minuten bei einer Temperatur von 70°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 2 ml Ethanol (100%) wurde das Gemisch über eine QIAamp Midi Säule für 3 Minuten bei 3000 rpm ($\sim 1850g$) in zwei Arbeitsschritten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule mit 2 ml Puffer AW1 beladen und für 1 Minute bei 5000rpm zentrifugiert. Entsprechend wurde die Säule mit Puffer AW2 beladen und für 15 Minuten zentrifugiert. Mit 300 μl Puffer AE wurde die an die Säule gebundene DNA durch Zentrifugation für 5 Minuten mit 5000 rpm eluiert und in Reaktionsgefäße überführt. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C und -80°C .

3.3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration der aufgereinigten Proben wurde mittels UV-Photometrie bestimmt. Der Leerwert wurde mit dem gleichen Mischungsverhältnis wie die Probe, d.h. 5 μl AE-Puffer plus 75 μl H_2O ermittelt. Die DNA-Lösung wurde mit destilliertem Wasser 1:15 in Greiner 96-well Platten verdünnt (5 μl DNA-Lösung, 75 μl Wasser).

3.3.3 Verdünnung der Proben

Um eine definierte Ausgangskonzentration für die folgenden Arbeitsschritte zu erhalten, wurde aus den Ergebnissen der photometrischen Messung ein Verdünnungsschema berechnet. Die Proben wurden mit einer 1:10-Verdünnung des Elutionspuffers von QIAGEN auf eine einheitliche Konzentration von

20 ng/µl gebracht.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden folgende Primer benutzt:

HNMT-(C314T)-SNP

<i>HNMT F:</i>	5'-CAATTAAAATTGATGGTGTGTCA	TS=52,7°C
<i>HNMT R:</i>	5'-TTTCTCCAACATTCTACTTTGGTA	TS=53,2°C

C5aR-(C245T)-SNP

<i>C5aR F:</i>	5'-AAGAGATGGCCCCAAATA	TS=51,2°C
<i>C5aR R:</i>	5'-TTCGAGACTCACCATGTTC	TS=49,8°C

IL4-C-(590T)-SNP

<i>IL-04 A:</i>	5'-GGGGCTCCTTCTCTGCATAGA	TS=58,7°C
<i>IL-04 S:</i>	5'-TGGGTAAGGACCTTATGGACCTG	TS=59,7°C

IL13-(Arg130Gln)-SNP

<i>IL13 130 S:</i>	5'-TTTGTAAAGGACCTGCTCTTACA	TS=54,7°C
<i>IL13 130 A:</i>	5'-GCACAGGCTGAGGTCTAAGCTA	TS=57,8°C

IL13-(C-1055T)-SNP

<i>IL13 1055 S:</i>	5'-TGGGGGTTCTGGAGGACT	TS=58,4°C
<i>IL13 1055 A:</i>	5'-AGCCTTAGTCCAGGTCAGAGAT	TS=55,3°C

***IL4RA*-(Ser478Pro)- und *IL4RA*-(Gln551Arg)-SNP**

IL4RA 478.551 S: 5'-CAGAGACGCCCCTCGTCAT TS=59,9°C

IL4RA 478.551 A: 5'-CAGGCTTGAGAAGGCCTTGTAAC TS=60,5°C

Diese Primer schließen beide SNPs ein.

***IL4RA*-(Ile50Val)-SNP**

IL4RA 50 B: 5'-CATGCTCGCTGGGCTTGAA TS=61,5°C

IL4RA 50 L: 5'-CCAGCCAGCCTACAGGTGA TS=59,1°C

Tab. 3: Protokolle für die Single- bzw. Duplex-PCR-Ansätze. Bei allen PCR-Ansätzen wurde mit der Annealingtemperatur = 52°C gearbeitet.

	<i>IL13</i> -(Gln110Arg) <i>IL13</i> -(C-1055T)	<i>IL4RA</i> -(Ser478Pro) <i>IL-4RA</i> -(Gln551Arg)	<i>HNMT</i> -(C314T) <i>IL4</i> -(C-590T)	<i>C5aR</i>
H ₂ O	18,40µl	18,90µl	17,90µl	18,90µl
Puffer (10x)	2,50µl	2,50µl	2,50µl	2,50µl
mit MgCl ₂ (15mM)	(1,5mM MgCl ₂)	(1,5mM MgCl ₂)	(1,5mM MgCl ₂)	(1,5mM MgCl ₂)
dNTP (je 2,5mM)	1,00µl (0,10mM)	1,00µl (0,10mM)	1,00µl (0,10mM)	1,00µl (0,10mM)
Primer 1 (10 µM)	0,25µl (0,1µM)	0,25µl (0,1µM)	0,50µl (0,20µM)	0,25µl (0,1µM)
Primer 2 (10 µM)	0,25µl (0,1µM)	0,25µl (0,1µM)	0,50µl (0,20µM)	0,25µl (0,1µM)
Primer 3 (10 µM)	0,25µl (0,1µM)		0,25µl (0,1µM)	
Primer 4 (10 µM)	0,25µl (0,1µM)		0,25µl (0,1µM)	
Taq (5 U/µl)	0,10µl (0,50 U)	0,10µl (0,50 U)	0,10µl (0,50 U)	0,10µl (0,50 U)
DNA (20ng/µl)	2,00µl	2,00µl	2,00µl	2,00µl
Gesamtvolumen	25,00µl	25,00µl	25,00µl	25,00µl

Die PCR lief unter folgenden Konditionen ab:

Initialer Denaturierungsschritt bei 95°C für 10min

PCR-Zyklus:

Denaturierung	95°C	10sec
Annealing	52°C	30sec
Elongation	72°C	40sec

Es wurde mit 50 Zyklen gearbeitet und nach zweiminütiger Finalelongation auf 4°C abgekühlt.

3.3.5 Restriktionsenzymatische Spaltung

Um den SNP des Kandidatengens *C5aR* nachzuweisen, wurde das PCR-Produkt mit folgendem Reaktionsansatz bei 37°C für 90 Minuten restriktionsenzymatisch gespalten.

PCR-Produkt	10,0µl
Aqua	5,65µl
BPU 1103 10u/µl	0,35µl
BSA	2,0µl
BPU-Puffer	2,0µl
<hr/>	
	20,0µl

Die Reaktion wurde mit 1,5µl Probenauftragspuffer gemischt und in Taschen eines 3%-Agarosegels aufgetragen. Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch getrennt. Eine Lagerung der Proben zur späteren Verarbeitung wurde bei –20°C vorgenommen.

C/C C/T C/T T/T T/T

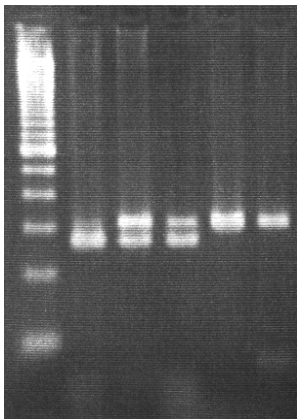


Abb. 12: Genotypanalyse des *C5aR*-(C-245T)-SNP verschiedener Individuen mittels PCR-Amplifikation und Restriktionsverdau mit BPU 1103. Das (T245)-Allel wird nicht verdaut. Es resultiert eine Bandenlänge von 301 bp (obere Bande). Liegt das (C245)-Wildtypallel vor, ergeben sich Fragmente mit einer Größe von 258 bp (untere Bande) und 43 bp (nicht zu sehen). Das Enzym BPU 1103 schneidet die Sequenz folgendermaßen:

GCTNAGC

CGANTCG

Wobei N für eine beliebige Base steht

3.3.6 Gelelektrophorese (C5aR)

Jeweils 10 µl des PCR-Produktes beziehungsweise des Restriktionsansatzes wurden auf einer Mikrotiterplatte mit 1 µl Proben-Auftragspuffer gemischt und in die Taschen eines 3%-Agarosegels pipettiert und in TBE-Puffer elektrophoretisch bei 90 V und 400 mA für 60 min aufgetrennt. Als Marker wurde eine 100 bp-DNA-Leiter verwendet. Die Färbung erfolgte in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 10 Minuten, anschließend wurde in einem Wasserbad für 10 Minuten entfärbt. Unter einem UV-Transilluminator mit einer Wellenlänge von 312 nm konnten die aufgetrennten Banden durch Fluoreszenz detektiert und photographiert werden.

3.3.7 LightCycler

3.3.7.1 Aufbau

Der LightCycler besteht aus zwei funktionellen Komponenten, der Thermocycler-Einheit und der Fluoreszenz-Meßeinheit. Das Gerät kann mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidproben sequenzspezifische Fluoreszenz messen. Die Reaktion findet in 32 Glaskapillaren statt, die gleichzeitig als Küvetten für die Fluoreszenzmessung dienen. Eine Hochleistungsleuchtdiode emittiert blaues Licht, das nach Passage eines Filters und eines Kollimators eine Wellenlänge von 470 nm hat und die Proben anregt. Drei unabhängige Photoelemente können Licht der Wellenlängen 530 nm, 640 nm und 710 nm gleichzeitig detektieren.

3.3.7.2 Sonden

Um eine Punktmutation nachzuweisen, werden zwei Oligonukleotidsonden eingesetzt. Die erste Sonde, der sogenannte „Sensor“, bindet an den 5'-Abschnitt der zu untersuchenden Region und ist an seinem eigenen 3'-Ende mit dem Fluorophor Fluoreszin gekoppelt. Die zweite Sonde, der „Anchor“, bindet an den 3'-Abschnitt der spezifischen genomischen DNA und ist entweder mit

dem Farbstoff LightCyclerRed-640 oder LightCyclerRed-705 an seinem eigenen 5'-Ende gekoppelt. Binden nun beide Sonden an den Zielabschnitt der genomischen DNA, dann liegen die Farbstoffe in unmittelbarer Nähe zueinander. Wird der „Sensor“-Farbstoff durch die Bestrahlung mit der Leuchtdiode angeregt, kann er die aufgenommene Energie an den „Anchor“-Farbstoff weitergeben, der seinerseits angeregt wird und Licht einer anderen Frequenz emittiert, das vom LightCycler detektiert werden kann. Dieser sogenannte **Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)** tritt nur auf, wenn beide Sonden an ihre Zielsequenz binden und die Farbstoffe Kopf-an-Kopf zu liegen kommen.

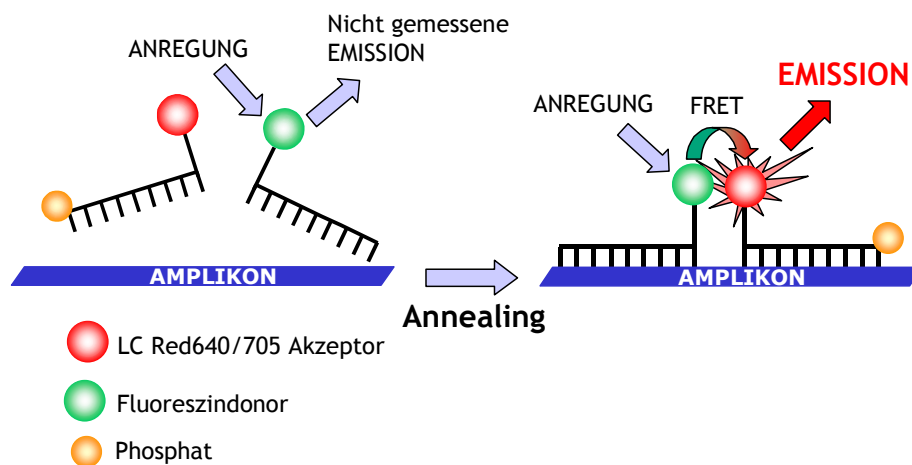


Abb. 13: Prinzip des FRET bei Hybridisierung der Sonden mit der Zielsequenz und Anregung (nach LightCycler-Manual, Roche).

Das Thermoelement kühlt das Reaktionsgemisch nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C auf 45°C ab. Anschliessend wird die Temperatur schrittweise erhöht und zeitgleich die Fluoreszenz gemessen. So kann eine Schmelzkurve aufgezeichnet werden, da die Intensität der Fluoreszenz proportional mit der Ablösung der Sonden von der untersuchten DNA abnimmt. Eine einzige unterschiedliche Base in der untersuchten Zielsequenz (Punktmutation) bewirkt eine schlechtere Hybridisierung mit der Sonde und so eine um einige Grad Celsius verschobene Schmelzkurve.

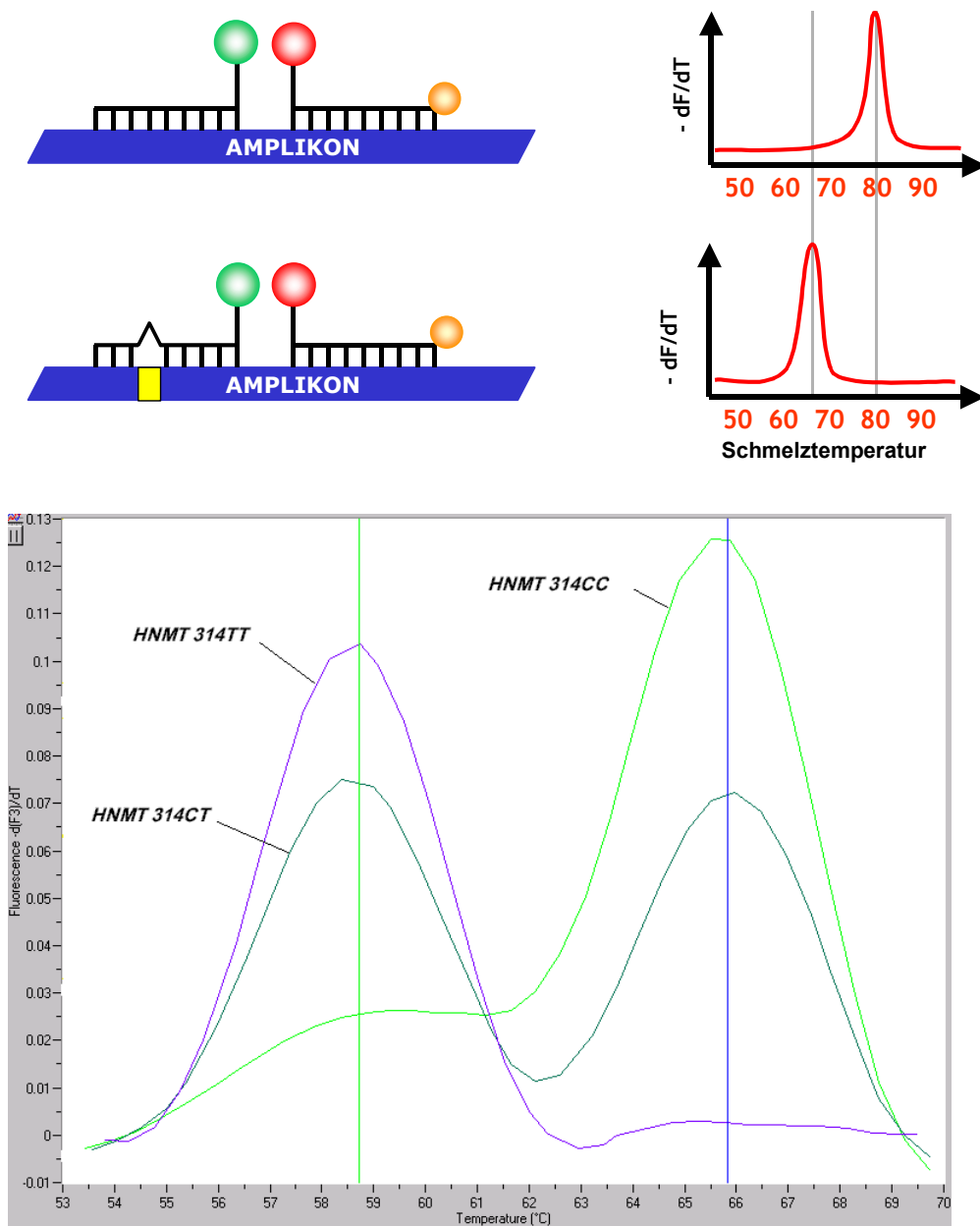


Abb. 14: **Oben:** Die Abbildung zeigt schematisch das Prinzip der Mutationsanalyse mit einer Wildtyp-spezifischen Sonde. **Unten:** Die HNMT-(C314T)-Genotypisierung zeigt beispielhaft wie das Hybrid aus Sonde und untersuchtem Amplikon durch die „fehlerhafte“ Anlagerung nur einer Base instabiler wird und seine Schmelztemperatur dadurch um einige Grad Celsius niedriger liegt.

Für die Genotypisierung wurden folgende Oligonukleotid-Sonden eingesetzt:

HNMT-(C314T)-SNP

Sensor: 5'-AgCTTgTAgCCAAgA**C**ATCgAACC $T_S=61,7^\circ\text{C}$

Anchor: 5'-LC-Red705-CgAgAACgTAAAgTTTgCTTggCAT p $T_S=63,8^\circ\text{C}$

IL4-C-(590T)-SNP

Sensor: 5'-LC-Red640-gAACATTg**C**CCCCCAgTg p $T_S=60,5^\circ\text{C}$

Anchor: 5'-CgACCTgTCCTTCTCAAAACACTAAACTTg $T_S=64,4^\circ\text{C}$

IL13-(Arg130Gln)-SNP

Sensor: 5'-LC-Red640- TTTCAgTTGAAC**C**GTCCCTCGC p $T_S=64,2^\circ\text{C}$

Anchor: 5'-CAGGTCCTGTCTCTGCAAATAATGATGCTTTCTGA $T_S=69,5^\circ\text{C}$

IL13-(C-1055T)-SNP

Sensor: 5'-LC-Red705- CCTGCTCTTCCCTC**A**TTTTCTAG p $T_S=60,4^\circ\text{C}$

Anchor: 5'-CCCCTGCAGCCATGTCGCCTT $T_S=69,4^\circ\text{C}$

IL4RA-(Ser478Pro)-SNP

Sensor: 5'-CGCAGCTTCAGCAAC**C**CCCT $T_S=66,4^\circ\text{C}$

Anchor: 5'-LC-Red705-GCCACTCACCGTGTCCCAGAGAGCT p $T_S=69,4^\circ\text{C}$

IL4RA-(Gln551Arg)-SNP

Sensor: 5'-LC-640-CCAGTGGCTATCAAGGAGTTTGTA p $T_S=56,5^{\circ}\text{C}$

Anchor: 5'-TGCAGCCCCCGTCTCGGCCCCC $T_S=78,2^{\circ}\text{C}$

IL4RA-(Ile50Val)-SNP

Sensor: 5'-LC-640-TCCGTTGTTCTCAGGGACACACGT p $T_S=76,9^{\circ}\text{C}$

Anchor: 5'-AGCAGGTGGCACACGCACCCCGC $T_S=65,8^{\circ}\text{C}$

LightCycler Sondenansatz

Aqua ad inj. 7,1 μl

Sensor 1 0,2 μl

Anchor 1 0,25 μl

Sensor 2 0,2 μl

Anchor 2 0,25 μl

8,0 μl

Zu je 8 μl des PCR-Produktes wurden 8 μl Sondenansatz gegeben, in der Kapillare gemischt und für 30 Sekunden bei 3000 rpm zentrifugiert.

3.3.8 Statistische Methoden*Populationsbasierte Assoziationsstudien*

Die Allelfrequenzen für jeden SNP wurden errechnet. Der χ^2 - Test wurde angewendet, um die Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu bestimmen. Der Expectation-Maximization-Algorithmus des Programms Arlequin (Schneider S, Excoffier L. Arlequin (Version 2.0), Genetics and Biometry Laboratory, 2000)) wurde angewandt, um die Haplotypfrequenzen für jedes SNP-Paar zu bestimmen. Die Kopplungsungleichgewicht-(LD)-Statistik D' wurde auf der Basis der so

ermittelten Frequenzen errechnet [74]. Ein Wahrscheinlichkeitstest des Programms Arlequin wurde durchgeführt, um die Signifikanz von Abweichungen vom Kopplungsungleichgewicht zu untersuchen.

Das Grenzwerteffektmodell Generalized Estimation Equations (GEE) wurde angewendet, um die Assoziation zwischen Genotyp und den longitudinal gemessenen IgE-Werten zu ermitteln. GEE sind statistische Methoden um Einflussgrößen auf korrelierte Daten mittels Regression zu untersuchen.

Um die Veränderung der IgE-Werte während der sieben Jahre für die verschiedenen Genotypen zu testen, wurden Interaktionsterme zwischen Alter, Alter², Alter³ und Genotyp in das Modell aufgenommen.

Für jeden SNP wurden je ein kodominantes Modell und das in früheren Studien verwendete genetische Modell angewendet [75]. Gen-Gen- und Gen-Umweltinteraktionen wurden durch Einfügen von Interaktionstermen in das Regressionsmodell untersucht (z.B. mütterliches Rauchen). P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Um den möglichen Einfluss von systematischen Selektionsfehlern auf die Ergebnisse zu testen, wurde ein gewichtetes lineares Modell (weighted linear model (WLM)) angewendet, um die beobachteten Daten bezüglich der ursprünglichen Kohorte zu gewichten. Gewinnt man ähnliche statistische Koeffizienten bzw. Aussagen mit Hilfe des gewichteten linearen Modells und des Grenzwertmodells, ist ein systematischer Selektionsfehler unwahrscheinlich.

Für die Gene mit mehr als zwei Varianten wurden Haplotypanalysen durchgeführt. Die Drei-Lokus-Haplotypanalysen für das *IL4RA*-Gens wurden mit PHASE (Version 1.0) durchgeführt (Stephens M, 2001). Gewichtete lineare

Regression wurde dann für die IgE-Werte zu jedem Zeitpunkt getrennt durchgeführt.

Familienbasierte Assoziationsstudie

Wie bei der populationsbasierten Assoziationsstudie wurde auch hier das Grenzeffektmodell Generalized Estimation Equations (GEE) verwendet. Es wurde jedoch eine andere Kovariante definiert, die statt des Genotyps des Kindes die Transmission des mutierten Allels von beiden Eltern berücksichtigt.

3.3.8.1 Der modifizierte TDT für quantitative Merkmale:

Der TDT-Test, der auf der Auswertung kompletter Trios (Vater, Mutter, Kind) beruht, wurde im Abschnitt 1.2.2.4 bereits genauer beschrieben. Eine Modifikation des TDT für quantitative Merkmale wurde wie folgt vorgenommen und jeweils auf die longitudinalen Daten der Kinder der MAS-Kohorte angewandt [76]:

Der Grenzeffekt auf das arithmetische Mittel wird durch Kovarianten bestimmt und wird wie folgt errechnet: $\text{Log (IgE)}_{ij} = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 (\text{Geschlecht})_i + \beta_3 (\text{Alter})_{ij} + \beta_4 (\text{Alter}^2)_{ij} + \beta_5 (\text{Alter}^3)_{ij} + \varepsilon_{ij}$. Die Kovarianz wird definiert als: $\text{Corr}(\varepsilon_{ij}, \varepsilon_{ik}) = R_i(\alpha)$. Log (IgE)_{ij} bedeutet der j. IgE-Wert des i. Kindes, und x_{i1} ist eine Kovariante, die die Transmission von Allel 1 beider Eltern eines Kindes darstellt. Die Transmission nimmt Werte von $x_{i1} = H_i^M (T_i^M - \frac{1}{2}) + H_i^P (T_i^P - \frac{1}{2})$ an, wobei H_i^M und H_i^P jeweils einen Wert von 1 oder 0 annehmen, abhängig davon, ob die Mutter und der Vater des Kindes heterozygot für Allel 1 ist. Die Transmissionsindikatoren T_i^M und T_i^P werden Werte von 1 annehmen, wenn Allel 1 von jeweils Mutter oder Vater auf das Kind transmittiert wurde und 0 wenn nicht.

Alle Analysen wurden mit dem statistischen Paket STATA (Version 7) durchgeführt und die Analysen der Longitudinaldaten sowie die familienbasierten Analysen mit SAS (Version 8.2).

4 Ergebnisse

4.1 *IL4*-, *IL13*- und *IL4RA*-SNPs

4.1.1 Allel- und Genotypfrequenzen

Sechs Polymorphismen in o.g. Genen wurden auf Assoziation mit Atopie-relevanten Merkmalen in der MAS-Kohorte untersucht. Die Allelfrequenzen und Genotypverteilungen der untersuchten SNPs sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Allelfrequenzen und Genotypverteilung der SNPs, die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und Kopplungsungleichgewichts-Analysen (LD) bei 823 Kindern der MAS-Population.

<i>Interleukin-4-Rezeptor</i>	<i>Ile50Val</i>	<i>Ser478Pro</i>	<i>Gln551Arg</i>
Genotypverteilung			
P/P*	249 (31,0%)	17 (2,1%)	26 (3,2%)
W/P	395 (49,1%)	222 (27,4%)	256 (31,5%)
W/W	160 (19,9%)	572 (70,5%)	530 (65,3%)
Allelfrequenz [Freq(P)]	Ile50:55,5%	Pro478:15,8%	Arg551:19,0%
Hardy-Weinberg Gleichgewicht (χ^2)	0,02(p=0,89)	0,72(p=0,40)	0,54(p=0,46)
LD Statistik (D' und p-Wert)#			
<i>IL4-(C-590T)</i>	0,03	0,17	0,16
<i>IL13-(C-1055T)</i>	0,02	0,03	0,05
<i>IL13-(Arg130Gln)</i>	0,02	0,01	0,09
<i>IL4R-(Ile50Val)</i>		0,37	0,28
<i>IL4R-(Ser478Pro)</i>	<0,001		0,99
<i>IL4R-(Gln551Arg)</i>	<0,001	<0,001	
	<i>IL4-(C-590T)</i>	<i>IL13-(C-1055T)</i>	<i>IL13-(Arg130Gln)</i>
Genotypverteilung			
P/P*	28 (3,6%)	43 (5,3%)	43 (5,3%)
W/P	221 (28,1%)	301 (37,1%)	266 (32,9%)
W/W	537 (68,3%)	467 (57,6%)	499 (61,8%)
Allelfrequenz [Freq(P)]	Allel T:17,6%	Allel T:23,9%	Gln130:21,8%
Hardy-Weinberg Gleichgewicht (χ^2)	0,78 (p=0,38)	0,38(p=0,54)	0,93(p=0,33)
LD Statistik (D' und p-Wert)			
<i>IL4-(C-590T)</i>		0,19	0,33
<i>IL13-(C-1055T)</i>	<0,001		0,58
<i>IL13-(Arg130Gln)</i>	<0,001	<0,001	
<i>IL4R-(Ile50Val)</i>	0,70	0,73	0,72
<i>IL4R-(Ser478Pro)</i>	0,31	0,48	0,88

<i>IL4R-(Gln551Arg)</i>	0,30	0,27	0,53
-------------------------	------	------	------

*P und W stehen für Polymorphismus und Wildtyp.

Die Genotypverteilungen für die sechs Polymorphismen wichen nicht vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab ($p > 0,05$). Statistisch signifikante Kopplungsungleichgewicht-Werte traten jeweils zwischen den Varianten innerhalb des *IL13*-Gens und des *IL4RA*-Gens auf. Höchste paarweise D' -Werte fanden sich zwischen Ser478Pro und Gln551Arg ($|D'| = 0,99$) gefolgt von C-1055T und Arg130Gln ($|D'| = 0,58$).

4.1.2 Phänotyp-Genotyp Assoziationen und Haplotypanalysen

Nicht-genetische Faktoren, wie mütterliches Rauchen, Einzugsgebiet, Geburtsmonat, Schulausbildung der Eltern, Anzahl der Schwangerschaften der Mutter und Stillzeit, waren weder mit der Genotypverteilung der SNPs noch mit den Gesamt-IgE-Konzentrationen assoziiert und wurden daher als Störgrößen in dieser Population ausgeschlossen.

Die populationsbasierte statistische Analyse der Longitudinaldaten ergab: Homozygote und heterozygote Träger des (Gln130)-Allels von *IL13* hatten signifikant höhere IgE-Werte ($p < 0,0001$ und $p = 0,0043$) als homozygote Träger des (Arg130)-Wildtypallels unter Verwendung des kodominanten Modells. Der Genotyp TT im Promotor des *IL13*-Gens (Position –1055) war im rezessiven Modell ebenfalls mit erhöhten IgE-Werten (0,29kU/l) assoziiert (p -Wert = 0,0002). Die angewandten Grenzwertmodelle ermitteln die statistischen Unterschiede der IgE-Werte über den gesamten Zeitraum. Im Gegensatz dazu zeigen die Abbildungen 15 und 16 deutlich die Unterschiede der mittleren IgE-Werte (log-transformiert) zu jedem Zeitpunkt im Alter von 1 bis 7 Jahren sowohl bei Jungen als auch bei Mädchen.

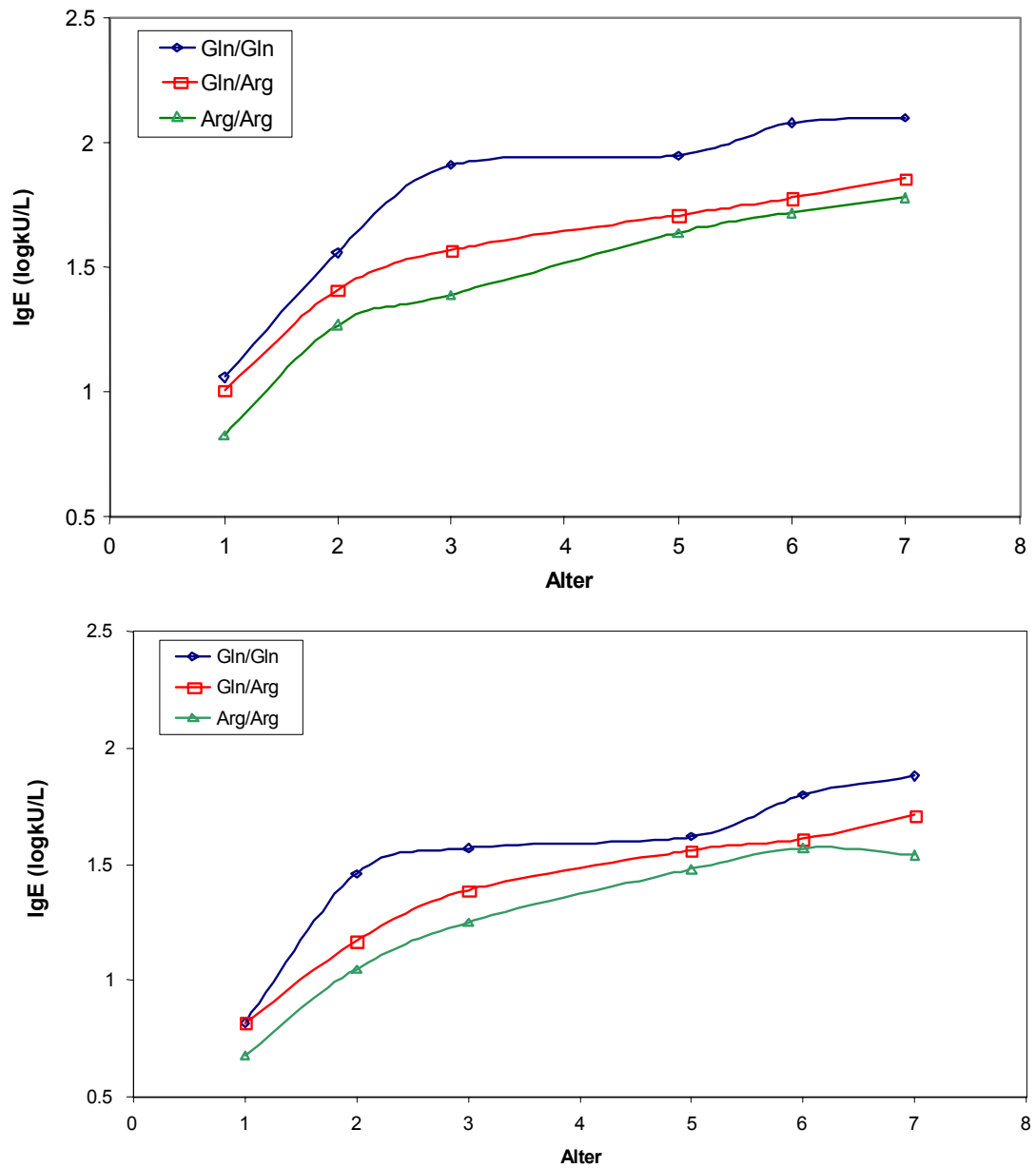
IL13-(Arg130Gln)

Abb. 15: Darstellung der mittleren Differenzen der Gesamt-IgE Serumkonzentrationen der Kinder der MAS-Population für die verschiedenen Genotypen des *IL13*-(Arg130Gln)-SNP in Abhängigkeit vom Lebensalter. Oben für das männliche, unten für das weibliche Geschlecht.

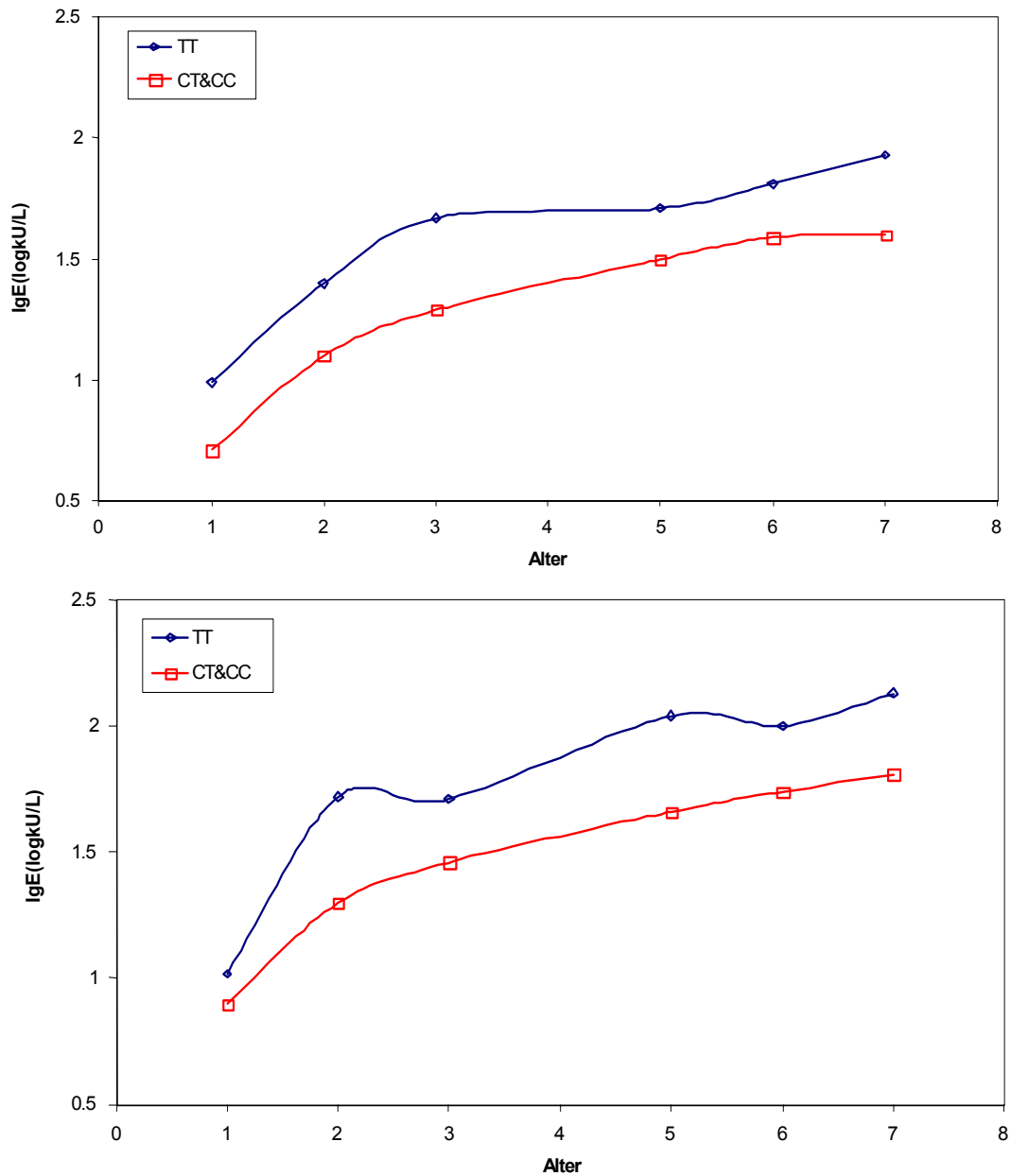
IL13-(C-1055T)

Abb. 16: Darstellung der mittleren Differenzen der Gesamt-IgE Serumkonzentrationen der Kinder der MAS-Population für die verschiedenen Genotypen des *IL13-C-1055T*-SNP in Abhängigkeit vom Lebensalter. Oben für das männliche, unten für das weibliche Geschlecht.

Zwischen den anderen 4 SNPs und Gesamt-IgE-Werten konnte keine Assoziation gefunden werden. Weder Zwei-Lokus (Ser478Pro-Gln551Arg), noch Dreilokus-Haplotypanalysen (Ile50Val-Ser478Pro-Gln551Arg) konnten einen Hinweis auf Assoziation von *IL4RA* mit IgE-Werten geben. Es konnte auch kein Einfluss eines SNP auf das Ausmaß der IgE-Änderung festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).

Wie unter 1.3.5.2 beschrieben, waren Analysen von 5q31 Markern bzw. *IL13*-SNPs insbesondere bei Nicht-Atopikern signifikant [19, 24]. Um diese Beobachtung in der MAS-Kohorte zu überprüfen, wurden zusätzlich Analysen in 331 atopischen Kindern und 165 nicht-atopischen Kindern getrennt durchgeführt. Atopie wurde als hohes spezifisches IgE (>0,7 kU/L) gegen eines der getesteten Allergene bzw. durch hohes Gesamt-IgE festgelegt. Nicht-Atopiker waren Kinder, die keinerlei Sensibilisierung aufwiesen (spezifisches IgE gegen jedes der getesteten Allergene <0,35 kU/L zu mindestens 4 Messzeitpunkten und ohne Diagnose einer atopischen Dermatitis).

Trotz geringer Fallzahl konnte der Vergleich dieser beiden Gruppen die Ergebnisse von Marsh et al. und Graves et al. für die SNPs Arg130Gln und C-1055T im *IL13* Gen bestätigen. *IL13*-(C-1055T) und *IL13*-(Arg130Gln) standen in starkem Kopplungsungleichgewicht, d.h. sie traten nicht unabhängig voneinander auf. Deshalb könnte die Wirkung auf die Gesamt-IgE-Werte eines SNP auf die fehlende Unabhängigkeit von dem anderen SNP zurückgehen. Zum Beispiel könnte die Assoziation zwischen dem TT-Genotyp des *IL13*-(C-1055T)-SNP und hohem Gesamt-IgE wegen des Kopplungsungleichgewicht ebenso auf den genetischen Effekt des (Gln130)-Allels zurückgehen.

Stratifizierte Analysen zwischen Nicht-TT-Trägern an der Position -1055 zeigten Hinweise auf einen Effekt des (Arg130Gln)-Lokus, wie Tab. 5 darstellt.

Tab. 5: Einzelne und kombinierte genetische Effekte von C-1055T und Arg130Gln im *IL13*-Gen nach Alter unter Berücksichtigung des Geschlechts in der MAS-Population.

<i>IL13</i> -(C-1055T)	<i>IL13</i> -(Arg130Gln)		
	Arg/Arg	Gln/Arg	Gln/Gln
CC & CT	Referenz	0,12(0,03-0,2)	0,27(0,13-0,42)
	(n=482)	(n= 251 p=0,0109)	(n=25 p=0,0002)
TT	0,37(0,11-0,64)	0,33(0,06-0,60)	0,33(0,09-0,56)
	(n=10 p=0,0055)	(n=15 p=0,0157)	(n=18 p=0,0067)

Als Referenzgenotyp wurde CC oder CT (Promotor) beziehungsweise Arg/Arg (Exon 4) im *IL13* Gen gewählt. Im Vergleich zu dieser Referenzgruppe wiesen MAS-Kinder mit dem Genotyp Arg/Gln und Gln/Gln um 0,12 log kU/l und 0,27 log kU/l erhöhte Serum-IgE-Werte auf. Dies lässt auf einen Effekt schließen, den jeder der beiden Loci getrennt voneinander bewirkt, der also nicht nur auf das Kopplungsungleichgewicht zurückgeht.

4.1.3 Interaktionstests

4.1.3.1 Gen-Gen-Interaktionen

Um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse zu minimieren wurden zusätzlich familienbasierte Analysen mit dem Transmissions Disäquilibrium Test für quantitative Merkmale durchgeführt (siehe 3.3.8). Die Transmission des (Gln130)-Allels und des Genotyps TT war mit hohem Gesamt-IgE assoziiert mit geschätzten Effekten von 0,17 log (kU/L); p=0,04 und 0,24 log (kU/L); p=0,086 siehe. Die grenzwertig signifikante Assoziation des TT-Genotyps könnte auf die geringe Anzahl auswertbarer Trios zurückzuführen sein. Zwischen einer spezifischen Alleltransmission und der Serum IgE-Konzentration konnte für die anderen SNPs keine Assoziation gefunden werden.

Tab. 6: Transmissions Disäquilibrium Test (TDT) für quantitative Merkmale für Gesamt-Serum-IgE-Werte und 6 SNPs in 382 kompletten Trios (Vater, Mutter, Kind) der MAS-Population nach Alter, Alter², Alter³ und Geschlecht adjustiert.

	β^*	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
<i>IL4</i> (C-590T)	-0.02	[-0,27 0,23]	0,88
<i>IL13</i>(C-1055T)	0,25	[-0,02 0,53]	0,07
Arg130Gln	0,16	[0,01 0,31]	0,04
Ile50Val	0,12	[-0,05 0,29]	0,18
Ser478Pro	0,14	[-0,03 0,30]	0,10
Gln551Arg	0,11	[-0,04 0,25]	0,16

*Der Wert β stammt aus dem gewichteten linearen Modell (WLM) siehe 3.3.8 und reflektiert die statistische Signifikanz dieser zusätzlichen Analyse und ist hier den klassischen Ergebnissen des TDT gegenübergestellt.

4.1.3.2 Gen-Umwelt-Interaktionen

Bei der Analyse des Einflusses mütterlichen Rauchens auf die beiden funktionellen Polymorphismen in *IL13* wurde folgender Zusammenhang festgestellt: Bei Kindern ohne Tabakrauchexposition zeigten der Genotyp -1055 TT und 130 Gln/Gln signifikant höhere Gesamt-IgE Werte 0,27 log(kU/l) bzw. um 0,25 log(kU/l) verglichen mit ihren Referenzgenotypen -1055 CC/CT bzw. 130 Arg/Arg. Bei den Kinder, deren Mütter rauchten, war dieser Effekt noch wesentlich stärker ausgeprägt: Ihre IgE-Werte waren auf 0,60 log(kU/l) bzw. 0,65 log(kU/l) erhöht. Diese Unterschiede zwischen Kindern mit und ohne Tabakrauchexposition waren im Grenzeffekt-Modell (siehe 3.3.8) statistisch signifikant mit p-Werten < 0,02. Pränatale Exposition zeigte ähnliche Effekte. Es war jedoch nicht möglich zwischen pränataler und postnataler Exposition zu unterscheiden, da nicht anzunehmen war, dass Mütter, die während der Schwangerschaft rauchten, nach der Geburt das Rauchen aufgaben. Keine statistisch signifikanten Hinweise auf Interaktionen brachte die Analyse der Effekte zwischen *IL13*-(C-1055T, Arg130Gln), *IL4*-(C-590T) und den drei SNPs im *IL4RA*-Gen. Die angewandten Grenzwertmodelle (siehe 3.3.8) ermitteln die statistischen Unterschiede der IgE-Werte über den gesamten Zeitraum. Im Gegensatz dazu zeigt die Abb. 17 deutlich die Unterschiede der mittleren IgE-

Werte (log-transformiert) zu jedem Zeitpunkt im Alter von 1 bis 7 Jahren in Abhängigkeit von Tabakrauchexposition und Genotyp.

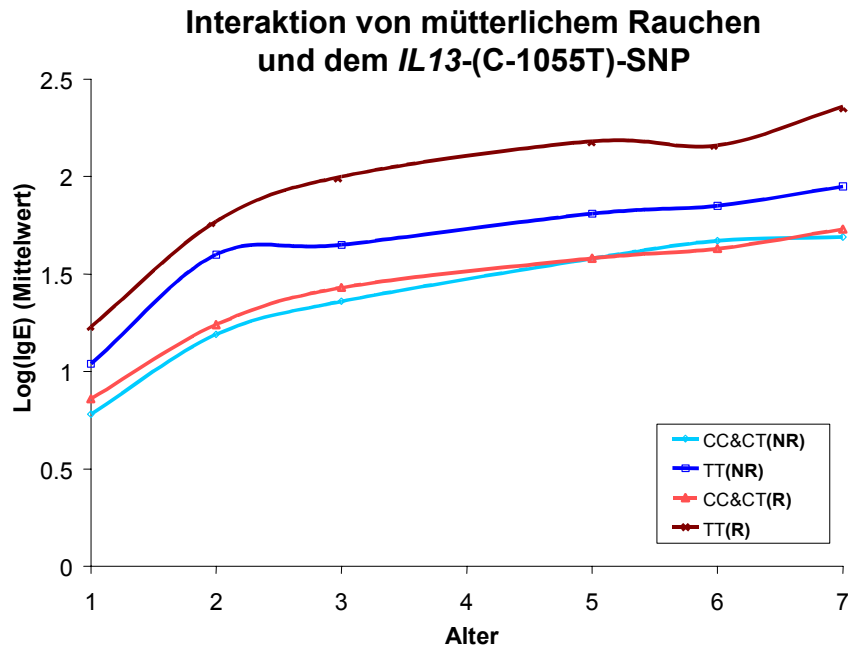


Abb. 17: Bei Kindern der MAS-Population ohne Tabakrauchexposition (NR) zeigte der Genotyp –1055 TT signifikant höhere Gesamt-IgE Werte verglichen mit ihren Referenzgenotypen – 1055 CC/CT. Mütterliches Rauchen (R) verstärkte diesen Effekt signifikant in der Gruppe der Kinder, die homozygot für das (T-1055)-Allel waren.

4.2 Der *HNMT*-(C314T)-SNP

Der Polymorphismus C314T im *HNMT*-Gen wurde in der MAS-Kohorte und in der Freiburger Asthmakohorte untersucht. Dabei ergaben sich folgende Genotypfrequenzen:

Tab. 7: *HNMT*-Genotypverteilung und Allelfrequenzen in der MAS- Kohorte sowie bei den Freiburger Kindern.

	n	WW [%]	WP [%]	PP [%]	Allelfreq (P)
Nicht-atop. MAS-Kontrollen	211	75	24	1	0,13
Nicht-Asthmatiker (MAS)	515	75	24	1	0,13
Asthmatiker (MAS)	85	74	26	0	0,13

Allergische Rhinitis (MAS)	81	77	22	1	0,12
Atopische Dermatitis (MAS)	181	81	19	0	0,10
Polysensibilisierung 7Jahre (MAS)	77	78	22	0	0,11
Polysensibilisierung 10 Jahre (MAS)	86	79	20	1	0,11
Freiburger Asthmatiker	176	74	23	3	0,14
Sensibilisierte Freiburger Asthmatiker	110	77	20	3	0,13
Milbensensibilisierte Freiburger Asthmatiker	60	78	17	5	0,14

P und W stehen für Polymorphismus und Wildtyp, wobei P für das (T314)-Allel des *HNMT* Gens steht.

Die obige Tabelle zeigt die Allelfrequenzen und Genotypverteilungen in Atopie-assoziierten Phänotypen in der MAS-Kohorte und in der Freiburger Asthma-Population. Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen Kindern mit Asthma, allergischer Rhinitis, atopischer Dermatitis oder Polysensibilisierung gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen festgestellt werden.

Besonderes Interesse galt der Hypothese, dass der Polymorphismus der *HNMT* mit dem Ausmaß der bronchialen Reaktivität auf Histamin assoziiert sein könnte. Weder in der Gruppe der Asthmatiker, noch in der Gruppe der Nicht-Asthmatiker unterschied sich die $PC_{20}FEV_1$ signifikant zwischen den verschiedenen *HNMT*-Genotypen. Auch die Freiburger Asthmatiker zeigten keine statistisch relevante Abhängigkeit vom Genotyp bei den belastungsinduzierten Provokationstests oder der Histaminprovokation.

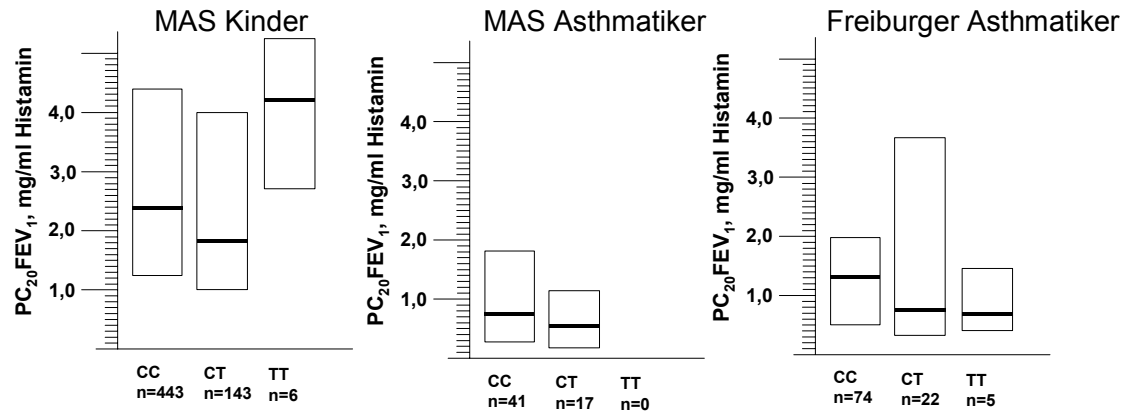


Abb. 18: Darstellung der PC₂₀FEV₁-Werte in Abhängigkeit des *HNMT*-Genotyps in der MAS-Kohorte, bei den MAS-Asthmatikern und den Freiburger Asthmatikern.

4.3 Der *C5aR*-(C-245T)-SNP

Der Promotorpolymorphismus im *C5aR*-Gen wurde in der MAS-Kohorte und der Barbados Population untersucht. Dabei ergaben sich folgende Genotyp- und Allelfrequenzen:

Tab. 8: *C5aR*-Genotypenverteilung und Allelfrequenzen in der MAS- Kohorte.

	n	WW [%]	WP [%]	PP [%]	Allelfreq (P)
Nicht-atop. MAS-Kontrollen	104	43	48	9	0,33
Asthmatiker (MAS)	83	53	37	10	0,29
Allergische Rhinitis (MAS)	76	47	44	9	0,31
Atopische Dermatitis (MAS)	177	46	42	12	0,33
Polysensibilisierung 7Jahre (MAS)	73	43	45	12	0,35
Polysensibilisierung 10 Jahre (MAS)	85	49	40	11	0,31
hohes Gesamt-IgE	73	58	31	11	0,27
niedriges Gesamt-IgE	165	44	51	5	0,31

P und W stehen für Polymorphismus und Wildtyp.

Tab. 9: Allelfrequenzen des *C5aR*-(C-245T)-SNP in der MAS-Kohorte und der Barbados-Population. Zum Vergleich zweier Populationen von untereinander nichtverwandten Individuen wurden die (nichtverwandten) MAS-Kinder den (nichtverwandten) Eltern der Barbados Population gegenübergestellt.

	MAS-Kinder	Barbados Eltern
Genotyp		
TT	382/815 (46,9%)	30/149 (20,1%)
TC	353/815 (43,3%)	80/149 (53,7%)
CC	80/815 (9,8%)	39/149 (26,2%)
Allelfrequenzen		
T	0,69	0,47
C	0,31	0,53

Der Unterschied in der Allelfrequenz des C-Allels bei den kaukasischen MAS-Kindern (31,5%) im Vergleich zu den afro-karibischen Individuen der Barbadospopulation (53%) war hochsignifikant ($p=0,0001$).

Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen MAS-Kindern mit atopischem Phänotyp, also Asthma, allergischer Rhinitis, atopischer Dermatitis oder Polysensibilisierung gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen festgestellt werden. Die Genotypverteilung in MAS-Kindern mit hohem IgE-Phänotyp unterschied sich nicht von der in MAS-Kindern mit niedrigem IgE-Phänotyp.

Weder in der Gruppe der Asthmatiker noch in der Gruppe der Nicht-Asthmatiker unterschied sich die $PC_{20}FEV_1$ signifikant zwischen den verschiedenen Genotypen des *C5aR*. Auch in der Barbados-Population konnte keine Assoziation mit Asthma-relevanten Phänotypen beobachtet werden.

5 Diskussion

Diese Arbeit untersuchte den Effekt von insgesamt acht potentiell funktionellen Varianten in Kandidatengenen für allergische Erkrankungen in einer großen deutschen Geburtskohorte (MAS-90), einer afro-karibischen (Barbados)-Population sowie einer weiteren kaukasischen Population (Freiburger Asthmatiker) auf Asthma und Atopie-assoziierte Merkmale. Erstmals wurden zu diesem Zweck longitudinale IgE-Messungen über sieben Jahre auf eine Assoziation mit verschiedenen Polymorphismen innerhalb des *IL13*-, *IL4*- und *IL4RA*-Gens untersucht.

In dieser Untersuchung konnte eine signifikante Assoziation zwischen zwei SNPs im *IL13*-Gen und hohen IgE-Werten in einer großen pädiatrischen Geburtskohorte nachgewiesen werden. Homozygote und heterozygote Träger des *IL13*-(Gln130)-Allels (SNP im Exon 4) wiesen signifikant höhere IgE-Werte als homozygote Träger des *IL13*-(Arg130)-Wildtypallels auf. Der Genotyp TT im Promotor des *IL13*-Gens (Position –1055) war ebenfalls mit erhöhten IgE-Werten assoziiert. Sehr konsistent waren die signifikanten Unterschiede der mittleren IgE-Werte für die jeweiligen Genotypen über den Beobachtungszeitraum von 7 Jahren zu sehen.

Epidemiologische und tierexperimentelle Studien deuten auf Tabakrauchexposition als potentiellen Risikofaktor für erhöhte Gesamt-IgE-Antikörperkonzentrationen hin [77, 78, 79]. In dieser Arbeit konnte ein Interaktionseffekt zwischen Tabakrauchexposition der untersuchten Kinder und den beiden funktionellen SNPs des *IL13*-Gens auf die Gesamt-IgE Werte beobachtet werden und damit eine mögliche Gen-Umwelt-Interaktion in dieser Population aufgedeckt werden.

IL13 wird auf dem langen Arm des Chromosom 5 kodiert, einer Region die in

mehreren Studien mit Gesamt-IgE-Konzentrationen und anderen Atopie-assoziierten Phänotypen eine Kopplung aufwies [19, 80, 81, 82]. Die hier aufgezeigten Daten unterstützen die Beobachtungen von Graves et al. und Marsh et al.. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten fanden wir keine Assoziation von *IL4*- bzw. *IL4RA*-SNPs oder Haplotypen hinsichtlich Gesamt-IgE-Werten.

5.1 Das Zytokin IL-13

Auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q31-33) befinden sich die Gene, die für Zytokine der T-Helferzellen vom Typ2 kodieren. Von den TH2-Zytokinen dieser chromosomalen Region wurde vor allem IL-4 intensiv erforscht wegen der bekannten Rolle von IL-4 bei der Differenzierung von T-Zellen in TH2-Zytokin produzierende Zellen. *IL13* liegt nur 25 Kilobasen zentromerisch von *IL4* und in der gleichen Orientierung, was zu der Spekulation führte, dass diese Gene während der Evolution durch Duplikation entstanden sein könnten. Zusätzlich zu ihrer strukturellen Ähnlichkeit sind sie sich auch bemerkenswert ähnlich in ihrer Funktion.

Trotz der recht ähnlichen biologischen Aktivität von IL-13 und IL-4 zeigt IL-13 spezifische Effekte. Studien im Mausmodell haben IL-13 kürzlich als einen entscheidenden Mediator in der Effektorphase der allergischen Atemwegsreaktion identifiziert [83, 84]. Einige Gruppen konnten zeigen, dass die Blockade von endogenem IL-13 durch löslichen IL-13-Rezeptor, der spezifisch IL-13 bindet, das Ausmaß der BHR und der pulmonalen Becherzellhyperplasie in sensibilisierten Mäusen reduzieren kann, wogegen die Neutralisation von IL-4 nicht diese Wirkung hat [85]. Weiterhin bilden Mäuse, denen IL-13 als rekombinantes Zytokin zugeführt wird oder in den Lungen überexprimiert wird, einen dem menschlichen Asthma sehr ähnlichen Phänotyp aus mit BHR, eosinophiler Entzündung und Becherzellhyperplasie.

5.1.1 Die Rolle der *IL13*-(Arg130Gln)- und *IL13*-(C-1055T)-SNPs

Kürzlich zeigten Graves et al. eine Assoziation von Polymorphismen im Promotor und der kodierenden Region von *IL13* mit hohen IgE-Werten. Es wurden insgesamt sieben Polymorphismen untersucht, von denen vier in engem Kopplungsungleichgewicht mit einer Variante in der kodierenden Region stehen, die einen Aminosäureaustausch im Exon 4 an der Position 130 bewirkt. Dieser SNP *IL13*-(Arg130Gln) war in zwei Gruppen von deutschen Kindern [24, 86] und einer Gruppe US-amerikanischer Kinder [87] stark mit erhöhten Serum-IgE-Konzentrationen assoziiert ($P=0,000002$). Insgesamt wurden 1399 Kinder genotypisiert. Der Promotorpolymorphismus *IL13*-(C-1055T) war in geringerem Maß mit *IL13*-(Arg130Gln) gekoppelt und war weniger signifikant mit hohen IgE-Konzentrationen assoziiert.

Unsere Arbeit konnte die Ergebnisse von Graves et al. in der MAS-90 Kohorte bestätigen und darüber hinaus sehr anschaulich die signifikante Erhöhung der Gesamt-IgE Werte über den gesamten Beobachtungszeitraum von sieben Jahren in beiden Geschlechtern nachweisen (siehe Abb. 15 und

Abb. 16). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass jede der beiden Varianten *IL13*-(Arg130Gln) und *IL13*-(C-1055T) einen getrennten Effekt auf die hohen IgE-Konzentrationen zu haben scheint, unabhängig vom Kopplungsungleichgewicht zwischen ihnen. In unseren Untersuchungen konnte kein Zusammenhang zwischen den Polymorphismen von *IL13* und Asthma hergestellt werden. Aufgrund der geringen Anzahl von Asthmatikern in der MAS-Kohorte und der recht milden Ausprägung des asthmatischen Phänotyps bei den meisten Kindern ist diese Beobachtung jedoch nicht aussagekräftig.

Zum gleichen Ergebnis führte die familienbasierte Auswertung der Transmission (TDT) mit den wiederholten IgE-Messungen als abhängige Variable. Auch hier zeigte sich eine Assoziation mit den beiden *IL13*-SNPs, was bedeutet, dass diese beiden Varianten entweder direkt die Serum-IgE-Konzentration beeinflussen oder andererseits in engem

Kopplungsungleichgewicht mit dem eigentlich verantwortlichen Gen stehen könnten.

Studien im Tiermodell gaben Hinweise darauf, dass IL-13 nicht nur für die IgE-Produktion wichtig ist, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung eines Asthma-ähnlichen, von IL-4 unabhängigen, Phänotyps ist [83, 84, 88]. Mehrere epidemiologische Studien haben die Rolle von IL-13 bei der Krankheitsentstehung von Asthma bronchiale beim Menschen untersucht.

Eine signifikante Assoziation zwischen *IL13* Varianten und Asthma wurde in britischen, japanischen und niederländischen Populationen nachgewiesen [23, 89, 90], was die wichtige Rolle dieses Zytokins bei der Entwicklung von Asthma untermauert. Allerdings wurde in keiner dieser Studien eine signifikante Assoziation mit hohen IgE-Werten nachgewiesen.

Van der Pouw Draan et al. untersuchten den Effekt des (T-1055)-Allels auf Gesamt-Serum-IgE-Werte ausschließlich in Asthmatikern. Problematisch hierbei ist jedoch, dass die Variabilität dieses Merkmals zu niedrig war, um kleine Unterschiede zwischen den Genotypen aufzudecken.

In einer Studie von Heinzmann et al. wurden die IgE-Konzentrationen in zwei Klassen unterteilt: hoch und niedrig. Diese Vereinfachung birgt die Gefahr erheblicher Fehleinordnungen und reduziert wahrscheinlich den messbaren Effekt des (Gln130)-Allels auf IgE-Werte. Erschwerend kommt hinzu, dass klinische Phänotypen, wie IgE-Werte, sich ändernde Größen sind, die sich während des episodenhaften Krankheitsverlaufs und während des Lebens eines Individuums stark verändern können.

Denkbar wäre auch, dass die beiden Varianten im *IL13* Gen in britischen, japanischen und niederländischen Populationen unabhängig von der Ethnizität nur einen Effekt auf Asthma, nicht aber auf die Gesamt-IgE-Konzentrationen haben. Die vier oben genannten Studien analysierten die Gesamt-IgE-Werte in Individuen mit gesichertem Asthma. Dadurch könnte der geschätzte genetische Effekt durch diese nicht repräsentative Probenauswahl verfälscht worden sein.

5.2 Der *IL4*-(C-590T)-SNP

Aufgrund der pathophysiologischen Zusammenhänge bei der allergischen Immunreaktion, bei der IL-4 eine zentrale Rolle spielt, ist es naheliegend, nach Polymorphismen im *IL4*-Gen, insbesondere in dessen Promoter zu suchen, da hieraus Unterschiede in der Expression und/oder Funktionalität von *IL4* resultieren könnten.

Rosenwasser et al. fanden bei ihren Untersuchungen einen SNP im *IL4*-Promoter an der Position –590, der zu einem Basenaustausch von Cytosin zu Thymidin führt. *In vitro* Untersuchungen mit dieser Variante der *IL4*-Promoter-Sequenz erbrachten eine höhere Luziferase-Aktivität und zeigten im Electrophoretic Mobility Shift Assay eine vermehrte Bindung von Transkriptionsfaktoren. Außerdem war dieser SNP mit höheren IgE-Werten in asthmatischen Familien, die im National Jewish Center in Denver, Colorado, rekrutiert worden waren, assoziiert [21].

In einer japanischen Studie wurde ein signifikanter Zusammenhang des *IL4*-(T-590)-Allels mit Asthma beschrieben: Unter Verwendung des TDT-Tests wurde eine signifikant häufigere Vererbung des T-Allels an asthmatische Kinder festgestellt [91]. Allerdings konnte kein Zusammenhang zu IgE-Werten im Hinblick auf diesen *IL4*-Polymorphismus beobachtet werden. In ähnlicher Weise beschreibt Burchard et al. [92] eine Assoziation dieses *IL4*-SNP mit dem FEV₁-Wert bei weißen Asthmatikern, hingegen jedoch nicht mit erhöhten IgE-Werten.

In einer weiteren Untersuchung von Walley et al. [93] wurde der *IL4*-(C-590T)-SNP in 2 Populationen untersucht: Für die britische Population ergab sich keinerlei Assoziation mit Asthma oder anderen Atopie-relevanten Phänotypen wie z.B. ein erhöhtes Gesamt-IgE; dies bestätigte sich bis auf die Ausnahme einer schwachen Assoziation mit spezifischem IgE gegen Hausstaubmilben auch in den australischen Individuen.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden verschiedene Atopie-assoziierte Phänotypen im Hinblick auf eine Assoziation mit dem *IL4*-(C-590T)-Promoter Polymorphismus untersucht. Es konnte weder für Asthma noch für atopische Dermatitis oder allergische Rhinitis noch für spezifisches und Gesamt-IgE ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Möglicherweise steht der hier untersuchte SNP im Kopplungsungleichgewicht mit einer anderen genetischen Variante, die ursächlich für die zuvor beschriebenen Assoziationen sein könnte, oder es bestanden Unterschiede bei den verschiedenen Populationen hinsichtlich Ethnizität und/oder Umweltfaktoren.

Weiterhin könnte das *IL4*-(T-590)-Allel modifizierend wirken und den Schweregrad der Krankheit mitbestimmen [92, 94], aber möglicherweise nur unter bestimmten Bedingungen (Alter, Definition des Phänotyps) zum Tragen kommen.

5.3 Die Rolle der genetischen Varianten im *IL4RA*-Gen

IL-4 bindet an den IL-4 Rezeptor und bewirkt damit seine intrazelluläre Wirkung. Insgesamt sind sieben Polymorphismen in der kodierenden Region des *IL4RA* bekannt, die mit einem Aminosäureaustausch einhergehen [20, 25].

5.3.1 Die *IL4RA*-(Ser478Pro)- und *IL4RA*-(Gln551Arg)-SNPs

Hershey et al. identifizierten erstmals im *IL4RA* ein SNP, bei dem Guanin durch Adenosin an der Nukleotidposition 1902 ersetzt ist, was einen

Aminosäureaustausch von Glutamin nach Arginin in der zytoplasmatischen Region des Rezeptors zur Folge hat [25]. Hershey und Mitarbeiter fanden eine signifikante Assoziation des (Arg551Gln)-SNP mit Hyper-IgE-Syndrom, atopischer Dermatitis und Atopie in 50 prospektiv rekrutierten Erwachsenen (Mitarbeiter der Washington University School of Medicine). Durch Durchflusszytometrie wurde der Einfluss des Wildtyp- bzw. des polymorphen *IL4*-Rezeptor-Allels in peripheren mononukleären Blutzellen von Individuen unterschiedlichen Genotyps untersucht. Eine erhöhte Expression des niedrigaffinen IgE-Rezeptors (CD23) durch IL-4 um den Faktor 2,17 ($\pm 0,14$) wurde bei heterozygoten Trägern bzw. eine Verdreifachung ($3,07 \pm 0,62$) bei homozygoten Trägern des SNP beobachtet. In Bindungsassays war eine veränderte Bindungsspezifität für SHP-1, eine Phosphotyrosin-Phosphatase, die an der Signaltransduktion von IL-4 beteiligt ist, festzustellen.

Kruse et al. beschrieben eine Assoziation der (Pro478)- und (Arg551)-Allele mit niedrigen Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum von 181 deutschen Kindern, von denen 91% Atopiker waren ($p=0,0008$) [95]. Dieses Ergebnis wurde in US-amerikanischen und niederländischen Populationen bestätigt [96, 97]. *In vivo*-Immunoassays mit humanen T-Zellen zeigten dass ausschließlich beim Vorliegen beider Polymorphismen die Phosphorylierung von intrazellulären Substraten (Insulin-Receptor-like Substrates 1 und 2) zunahm, also die Signalkaskade beeinflusst wurde.

Unsere Daten weisen ähnliche Allelfrequenzen für diese SNPs in der MAS-Kohorte nach, wie sie von Kruse et al. beschrieben wurden. Wir konnten aber die Assoziation mit dem Gesamt-IgE in zwei vergleichbaren Subpopulationen innerhalb der MAS-Kohorte nicht bestätigen: Weder bei den 138 MAS-Kindern aus dem Raum Freiburg, der gleichen Stadt aus der Kruse et al. ihre Patienten rekrutierten: [Pro478: $-0,04 \log (\text{kU/L})$; Arg551: $-0,06 \log (\text{kU/L})$], noch bei den 331 Atopiker der insgesamt 823 Kindern.

Selbst verschiedene Umwelteinflüsse oder mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Populationen der beiden Studien können diese Diskrepanz nicht erklären. *IL4RA* wurde als Asthma- und Atopie-Suszeptibilitätsloкус diskutiert, gestützt auf Ergebnisse von Haplotypanalysen in Inzucht- und „Nicht-Inzucht“-Populationen [16]. Unsere Haplotypanalysen dagegen zeigten weder einen Hinweis auf synergistische Effekte der Varianten Ser478Pro und Gln551Arg, noch einen anderen Haplotypeneffekt auf atopische Erkrankungen und speziell auf das Gesamt-IgE.

5.3.2 Der *IL4RA*-(Ile50Val)-SNP

Die einzige extrazelluläre Variante des IL-4 Rezeptors, Ile50Val, wurde von Deichmann et al. [20] beschrieben und in zwei japanischen Populationen untersucht [98, 99]. Mitsuyasu et al. beschrieben eine signifikante Assoziation zwischen der Ile/Ile Variante des Rezeptors und Asthma, hohem Gesamt-IgE und spezifischem IgE. Die intrazelluläre Antwort der Rezeptorvariante Ile/Ile war bei Untersuchungen in PBMC um das dreifache erhöht. Die Expression des niedrigaffinen IgE-Rezeptors und die IgE-Synthese in transfizierten PBMC war erhöht. Diese Gruppe transfizierte humane und Maus-B-Zellen mit cDNA, die für die um eine Aminosäure veränderten Rezeptoren kodierte und testete mittels Luziferase- und Wachstumshormon-Aktivität die intrazelluläre Antwort auf IL-4 Stimulation. In Bindungsstudien konnten Mitsuyasu et al. andererseits keine veränderte Bindungsaffinität für IL-4 durch den *IL4*-Ile50Val Polymorphismus nachweisen (mittleres K_D Ile50=52 pM, mittleres K_D Val50 = 56 pM).

Gao et al. konnten weder die Assoziation mit Atopie in verschiedenen ethnischen Populationen zeigen noch strukturelle Veränderungen am Rezeptor durch die Variante im ComputermodeLL erklären [100].

Noguchi et al. [101], die eine japanische Population genotypisierten, konnten die Ergebnisse von Mitsuyasu et al. nicht bestätigen. Weder eine TDT-Analyse bei 86 Familien, noch eine Fall-Kontroll-Studie konnte einen Zusammenhang zwischen dem Ile50Val Polymorphismus und Asthma bzw. Atopie-spezifischen Merkmalen wie hohen IgE-Werten feststellen.

In der vorliegenden Arbeit war die *IL4*-Rezeptorvariante Ile/Ile nicht mit Gesamt-IgE oder anderen atopischen Merkmalen assoziiert, was sowohl mit den Ergebnissen von Noguchi et al. als auch von Heinzmann et al. [23], der eine japanische und eine britische Population auf Assoziationen untersuchte, übereinstimmt. Unterschiedliche Umwelteinflüsse oder ein falsch positives Resultat könnten die Diskrepanz der Ergebnisse der japanischen Gruppen erklären.

5.3.3 Die Assoziation von Atopie mit *IL4*- und *IL4RA*-SNPs

Obwohl in unseren Daten keine Assoziation mit *IL4* und den drei Polymorphismen des *IL4RA* beobachtet wurde, bleibt die Möglichkeit eines nicht detektierten genetischen Effekts bestehen. Der Probenumfang von 823 Kindern ist noch immer nicht groß genug, um schwache individuelle und interaktive genetischen Effekte zu bemerken. Bei Markerallelfrequenzen von 0,1-0,25 ist die kleinste mittlere detektierbare Differenz zwischen Mutanten- und Wildtypuntergruppen 0,12-0,15 log (kU/L) (wenn Fehler der ersten Art bzw. zweiten Art auf 0,05 bzw. 0,2 festgelegt werden). Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit relativ wenige der denkbaren Gen-Gen- und Gen-Umwelt Interaktionen, die zur Regulation von IgE beisteuern könnten, untersucht, und keine Interaktionen höherer Ordnung berücksichtigt. Selbst mit mehr Wissen über alle Faktoren könnte ein Randeffect eines jeden Einflussfaktors durch andere Elemente des gesamten Netzwerks verdeckt werden, was das Aufspüren kleiner Effekte einzelner Gene erschwert.

5.4 Die Rolle des *C5aR*-(C-245T)-SNP

Komplementkomponenten wird in jüngster Zeit eine modulierende Schlüsselverbindung zwischen angeborenen und spezifischen Immunantworten zugeschrieben. Die Arbeitsgruppe um Karp konnte in einem Mausmodell Komplementfaktor 5 als Risikofaktor für die Ausbildung von allergischem Asthma identifizieren. Mikroarrayanalysen von pulmonal exprimierten Genen und SNP-Analysen identifizierten das Gen, das für Komplementfaktor 5 kodiert, als Suszeptibilitätslokus für allergeninduzierte BHR[34].

Karp et al. beobachteten, dass die Variante des *C5* zu einer Dysregulation und damit zu einer verminderten IL-12 Produktion führte. Dies begünstigt eine TH2-Immunantwort, die für atopische Erkrankungen typisch ist. Das Gen, das beim Menschen für *C5aR* kodiert, liegt in der Region 19q13.3-q13.4 [39, 40], einem Locus, der durch Kopplungsstudien mehrfach in Zusammenhang mit Asthma gebracht wurde [41, 42, 43, 44]. Dieses Gen wurde daraufhin von uns mittels Sequenzierung auf Varianten untersucht (barnes, 2004).

In dieser Arbeit wurde der Promotorpolymorphismus *C5aR*-(C-245T) in zwei Populationen untersucht. Keines der untersuchten Merkmale wie Asthma, atopische Dermatitis, allergische Rhinitis, hohe Gesamt-IgE-Werte, Sensibilisierung und Polysensibilisierung variierte innerhalb der Genotypgruppen TT, CT, CC. Die PC₂₀FEV₁-Werte zeigten keine Unterschiede innerhalb der Genotyp-Gruppen.

Sehr deutlich waren dagegen die unterschiedlichen Allelfrequenzen bei den (kaukasischen) MAS-Kindern und bei der (afro-karibischen) Barbados-Population. Die Allelfrequenz der Wildtyp-Variante (C-245) war signifikant höher in der Barbados-Population (53%) verglichen mit den deutschen Kindern (31,5%). Unsere Daten aus diesen beiden Studienpopulationen legen den Schluss nahe, dass Individuen mit dem (T-245)-Allel kein größeres Risiko

tragen, Asthma oder eine BHR zu entwickeln.

5.5 Der *HNMT*-(C314T)-SNP

Die Histamin-N-Methyltransferase katalysiert den Hauptabbauweg des Histamins in menschlicher Bronchialschleimhaut. Die Funktionalität des *HNMT*-(C314T)-Polymorphismus (Ile105Thr) wurde von Preuss et al. *In vitro* und *in vivo* gezeigt [48]. Es wurde in 127 humanen Nierenbiopsien die Enzymaktivität bestimmt. Gewebeproben mit der Ile50 Enzymvariante zeigten signifikant niedrigere Enzymaktivitäten. Diese Beobachtungen wurden in transfizierten COS-1 Zellen bestätigt. Das T-Allel ging mit einer signifikant gesenkten Enzymaktivität der *HNMT* einher, was mit einem verzögerten Abbau des Histamins in der Lunge einhergehen könnte.

Da erhöhte Histaminkonzentrationen im Bronchialepithel theoretisch zu einer ausgeprägten Bronchokonstriktion führen, könnte der funktionelle Polymorphismus eine höhere Suszeptibilität für Asthma zur Folge haben. Die Gruppe um Yan fand eine signifikante Erhöhung der Allelfrequenz (0,14) des (T314)-Allells in einer Population kaukasischer Asthmatiker (n=192) im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,08; OR=1,9; p<0,01).

Unsere Ergebnisse konnten diesen Zusammenhang zwischen *HNMT*-Genotyp und Asthma nicht bestätigen. Keines der untersuchten Merkmale wie Asthma, atopische Dermatitis, allergische Rhinitis, hohe Gesamt-IgE-Werte, Sensibilisierung und Polysensibilisierung variierte innerhalb der Genotypgruppen TT, CT, CC. Die PC₂₀FEV₁-Werte unterschieden sich nicht innerhalb der Genotypgruppen. Unsere Daten aus zwei deutschen pädiatrischen Studienpopulationen legen den Schluss nahe, dass Individuen mit dem (T314)-Allel kein größeres Risiko tragen, Asthma oder eine BHR zu entwickeln.

5.6 Problematik genetischer Studien

5.6.1 Umweltfaktoren

Atopische Erkrankungen wie Asthma sind komplexe genetische Merkmale bei denen Gen-Gen- und Gen-Umweltinteraktionen vermutlich eine wichtige Rolle spielen. Populationen können verschiedenen Umwelteinflüssen unterliegen: Allergenexposition, Geburtstermin, Kontakt mit Viren und bakteriellen Antigenen sowie exogene Noxen wie Tabakrauch, Russ und Schwebstaub können die Vergleichbarkeit der Populationen signifikant vermindern beziehungsweise einen schwachen genetischen Effekt vollständig überdecken.

5.6.2 Phänotyp

Die unterschiedliche Ausprägung der atopischen Merkmale innerhalb einer Population (z.B. nur milde Formen von Asthma in der MAS-Kohorte) könnte ebenso unterschiedliche Resultate genetischer Studien erklären. Zusätzlich gibt es kein einheitliches Vorgehen zur Bestimmung eines atopischen Merkmals. Diese fehlende Standardisierung bei der Erhebung des Phänotyps erschwert die Vergleichbarkeit von Populationen oder Subpopulationen. Beispielsweise existiert kein Goldstandard zur physiologisch sinnvollen Bestimmung der BHR. Diese Problematik wird bei den Phänotypen der atopischen Dermatitis und allergischen Rhinitis, für die keine objektivierbaren physiologischen Messgrößen existieren, auf deren Basis eine absolute Diagnose gestellt werden könnte, noch deutlicher. Allein relativ subjektive Symptome wie beispielsweise laufende, verstopfte oder juckende Nase müssen als Kriterien herangezogen werden.

5.6.3 Ethnizität

Unsere Ergebnisse der *C5aR*-Genotypisierungen zeigen hochsignifikante Unterschiede hinsichtlich der Allelfrequenz in unserer (kaukasischen) Population im Vergleich zur (afro-karibischen) Barbados-Population auf. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen anderer Studien, die Gene der

entzündlichen Reaktion in unterschiedlichen Populationen untersuchten. So treten viele SNPs in manchen ethnischen Gruppen in sehr unterschiedlicher Verteilung oder gar nicht auf [43, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109].

Der Selektionsdruck durch Infektionen war im Laufe der Evolution auf den einzelnen Kontinenten sehr verschieden. Die natürliche Selektion hat in den letzten Jahrhunderten zu signifikanten ethnischen Unterschieden in den Genen der Immunabwehrmechanismen und damit der allergischen Reaktion geführt. Diese ethnischen Verschiedenheiten in der Art und Verteilung der genetischen Varianten mag auch teilweise die Inkonsistenz mancher Studienergebnisse erklären. Die signifikanten ethnischen Unterschiede bei der Verteilung der „Entzündungsgen-Varianten“ (im Zusammenspiel mit den Umwelteinflüssen) könnten weiterhin die weltweit sehr unterschiedliche Prävalenz von Asthma, allergischer Rhinitis und atopischer Dermatitis zumindest teilweise erklären [58].

5.6.4 Kandidatengenstudien

Viele verschiedene Kandidatengene für Asthma und Atopie wurden in unterschiedlichsten Studien beschrieben und analysiert. Die oft widersprüchlichen Ergebnisse müssen mit Vorsicht interpretiert werden, da viele Genotypen oft auf Assoziation mit einer großen Zahl von Atopie-assoziierten (Sub-)Phänotypen getestet werden, so dass die ursprüngliche Population oft in sehr kleine Untergruppen zerfällt und geringe Fallzahlen die Aussagekraft der Untersuchung schwächen. Dies erhöht die Gefahr falsch positiver Ergebnisse. Bei der Auswertung der Ergebnisse kommt ein großes Spektrum an statistischen Methoden zum Einsatz, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Studien weiterhin erschwert. Zusätzlich mag in der Literatur auch die Tendenz eine Rolle spielen, positive Ergebnisse bevorzugt zu veröffentlichen, so dass viele Negativbefunde keine Erwähnung finden.

5.6.5 Gen-Gen-Interaktionen und Haplotypanalysen

Die Funktionalität von Polymorphismen ist ein entscheidendes Kriterium für die Auswahl als potentieller Kandidatengen. Befinden sich mehrere SNPs in einer regulatorischen Region eines Gens wie beispielsweise bei *IL4* und *IL13*, ist es wahrscheinlich, dass sie sich gegenseitig beeinflussen. Die individuelle Analyse eines einzelnen SNPs muss deshalb nicht unbedingt die *in vivo* Genfunktion reflektieren. Die *in vitro* ermittelten Unterschiede der Genexpression oder –funktion müssen kritisch bewertet werden, wenn noch weitere Polymorphismen im selben Gen die Funktionalität *in vitro* und *in vivo* beeinflussen könnten. Die Haplotypanalyse berücksichtigt dieses Gen-Gen Zusammenspiel von möglichen Kandidaten in einer Region und verbessert die Aussagekraft über mögliche Interaktionen oder deckt sie erst auf.

6 Zusammenfassung

Atopische Erkrankungen wie Asthma, atopische Dermatitis und allergische Rhinitis sind komplexe, multifaktorielle Erkrankungen. Diese Arbeit untersuchte Gen-Gen- und Gen-Umweltinteraktionen von insgesamt acht Polymorphismen in fünf Kandidatengenen.

1. In einer großen deutschen Geburtskohorte (Multizentrische Allergie Studie, MAS 90) mit longitudinalen klinischen und serologischen Daten wurde der Effekt von Polymorphismen in Genen, die für Interleukin-13, Interleukin-4 und dessen gemeinsamer Rezeptoruntereinheit IL4R- α kodieren, auf Atopie-assoziierte Merkmale untersucht. Zwei Polymorphismen im *IL13*-Gen (Arg130Gln, C-1055T) zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum von sieben Jahren eine signifikante Assoziation mit erhöhten Gesamt-IgE-Werten. Weiterhin konnte diese Untersuchung zeigen, dass mütterliches Rauchen diesen Effekt auf die IgE-Werte noch verstärkt.
2. Ein Polymorphismus des Komplementfaktor-C5-Rezeptors, der im Mausmodell als Suszeptibilitätslokus für Asthma identifiziert wurde, wurde in der MAS-Kohorte wie auch in einer afro-karibischen Population auf Assoziation mit Atopie-relevanten Merkmalen untersucht. Eine Assoziation konnte zwar nicht gefunden werden, jedoch waren hochsignifikante Unterschiede in der Allelfrequenz in den zwei ethnischen Gruppen auffällig; ein Phänomen, welches auch bei anderen genetischen Varianten in proinflammatorischen Genen beobachtet wurde .
3. Ein funktioneller Polymorphismus des histaminabbauenden Enzyms Histamin-N-Methyl-Transferase wurde auf eine Assoziation mit bronchialer Hyperreagibilität und Asthma in der MAS-Kohorte sowie in einer weiteren kaukasischen Population von asthmatischen Kindern überprüft. Weder eine Assoziation mit Asthma noch eine modulierende Wirkung auf den Schweregrad der bronchialen Hyperreagibilität konnte in den Studienpopulationen gefunden werden. Im Gegensatz zu Untersuchungen bei erwachsenen Asthmatikern scheint diese Variante bei kindlichem Asthma keine entscheidende Rolle zu spielen.

Literatur

- [1] Schramm, B.; Ehlken, B.; Smala, A.; Quednau, K.; Berger, K. and Nowak, D. (2003): Cost of illness of atopic asthma and seasonal allergic rhinitis in Germany: 1-yr retrospective study, *Eur Respir J* (vol. 21), No. 1, pp. 116-22.
- [2] Illi, S.; von Mutius, E.; Lau, S.; Bergmann, R.; Niggemann, B.; Sommerfeld, C. and Wahn, U. (2001): Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study, *Bmj* (vol. 322), No. 7283, pp. 390-5.
- [3] von Mutius, E.; Braun-Fahrlander, C.; Schierl, R.; Riedler, J.; Ehlermann, S.; Maisch, S.; Waser, M. and Nowak, D. (2000): Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy, *Clin Exp Allergy* (vol. 30), No. 9, pp. 1230-4.
- [4] von Mutius, E.; Martinez, F. D.; Fritzsche, C.; Nicolai, T.; Roell, G. and Thiemann, H. H. (1994): Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 149), No. 2 Pt 1, pp. 358-64.
- [5] Sandford, A.; Weir, T. and Pare, P. (1996): The genetics of asthma, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 153), No. 6 Pt 1, pp. 1749-65.
- [6] Skadhauge, L. R.; Christensen, K.; Kyvik, K. O. and Sigsgaard, T. (1999): Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs, *Eur Respir J* (vol. 13), No. 1, pp. 8-14.
- [7] Sengler, C.; Lau, S.; Wahn, U. and Nickel, R. (2002): Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments, *Respir Res* (vol. 3), No. 1, p. 7.
- [8] de Vries, J. E. (1998): The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 102), No. 2, pp. 165-9.
- [9] Izuhara, K. and Shirakawa, T. (1999): Signal transduction via the

- interleukin-4 receptor and its correlation with atopy, *Int J Mol Med* (vol. 3), No. 1, pp. 3-10.
- [10] Wills-Karp, M. (2001): IL-12/IL-13 axis in allergic asthma, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 107), No. 1, pp. 9-18.
- [11] Vercelli, D. (1993): Regulation of IgE synthesis, *Allergy Proc* (vol. 14), No. 6, pp. 413-6.
- [12] Terada, N.; Hamano, N.; Hohki, G.; Ikeda, T.; Sai, M.; Yamashita, T. and Konno, A. (1998): The potential role of interleukin-13 in eosinophilic inflammation in nasal mucosa, *Allergy* (vol. 53), No. 7, pp. 690-7.
- [13] Matsukura, S.; Stellato, C.; Georas, S. N.; Casolaro, V.; Plitt, J. R.; Miura, K.; Kurosawa, S.; Schindler, U. and Schleimer, R. P. (2001): Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism, *Am J Respir Cell Mol Biol* (vol. 24), No. 6, pp. 755-61.
- [14] Wills-Karp, M. (2000): The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits, *Respir Res* (vol. 1), No. 1, pp. 19-23.
- [15] Walley, A. J.; Wiltshire, S.; Ellis, C. M. and Cookson, W. O. (2001): Linkage and allelic association of chromosome 5 cytokine cluster genetic markers with atopy and asthma associated traits, *Genomics* (vol. 72), No. 1, pp. 15-20.
- [16] Ober, C.; Leavitt, S. A.; Tsalenko, A.; Howard, T. D.; Hoki, D. M.; Daniel, R.; Newman, D. L.; Wu, X.; Parry, R.; Lester, L. A.; Solway, J.; Blumenthal, M.; King, R. A.; Xu, J.; Meyers, D. A.; Bleecker, E. R. and Cox, N. J. (2000): Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations, *Am J Hum Genet* (vol. 66), No. 2, pp. 517-26.
- [17] Ober, C.; Tsalenko, A.; Willadsen, S.; Newman, D.; Daniel, R.; Wu, X.; Andal, J.; Hoki, D.; Schneider, D.; True, K.; Schou, C.; Parry, R. and Cox, N. (1999): Genome-wide screen for atopy susceptibility alleles in the Hutterites, *Clin Exp Allergy* (vol. 29 Suppl 4), No. 2, pp. 11-5.

- [18] Noguchi, E.; Shibasaki, M.; Arinami, T.; Takeda, K.; Maki, T.; Miyamoto, T.; Kawashima, T.; Kobayashi, K. and Hamaguchi, H. (1997): Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in a Japanese population, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 156), No. 5, pp. 1390-3.
- [19] Marsh, D. G.; Neely, J. D.; Breazeale, D. R.; Ghosh, B.; Freidhoff, L. R.; Ehrlich-Kautzky, E.; Schou, C.; Krishnaswamy, G. and Beaty, T. H. (1994): Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations, *Science* (vol. 264), No. 5162, pp. 1152-6.
- [20] Deichmann, K.; Bardutzky, J.; Forster, J.; Heinzmann, A. and Kuehr, J. (1997): Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 231), No. 3, pp. 696-7.
- [21] Rosenwasser, L. J.; Klemm, D. J.; Dresback, J. K.; Inamura, H.; Mascali, J. J.; Klennert, M. and Borish, L. (1995): Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy, *Clin Exp Allergy* (vol. 25 Suppl 2), No. 2-3, pp. 74-8; discussion 95-6.
- [22] Liu, X.; Nickel, R.; Beyer, K.; Wahn, U.; Ehrlich, E.; Freidhoff, L. R.; Bjorksten, B.; Beaty, T. H. and Huang, S. K. (2000): An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German multicenter atopy study (MAS-90), *J Allergy Clin Immunol* (vol. 106), No. 1 Pt 1, pp. 167-70.
- [23] Heinzmann, A.; Mao, X. Q.; Akaiwa, M.; Kreomer, R. T.; Gao, P. S.; Ohshima, K.; Umeshita, R.; Abe, Y.; Braun, S.; Yamashita, T.; Roberts, M. H.; Sugimoto, R.; Arima, K.; Arinobu, Y.; Yu, B.; Kruse, S.; Enomoto, T.; Dake, Y.; Kawai, M.; Shimazu, S.; Sasaki, S.; Adra, C. N.; Kitaichi, M.; Inoue, H.; Yamauchi, K.; Tomichi, N.; Kurimoto, F.; Hamasaki, N.; Hopkin, J. M.; Izuhara, K.; Shirakawa, T. and Deichmann, K. A. (2000): Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy, *Hum Mol Genet* (vol. 9), No. 4, pp. 549-59.
- [24] Graves, P. E.; Kabesch, M.; Halonen, M.; Holberg, C. J.; Baldini, M.;

- Fritzsche, C.; Weiland, S. K.; Erickson, R. P.; von Mutius, E. and Martinez, F. D. (2000): A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 105), No. 3, pp. 506-13.
- [25] Hershey, G. K.; Friedrich, M. F.; Esswein, L. A.; Thomas, M. L. and Chatila, T. A. (1997): The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor, *N Engl J Med* (vol. 337), No. 24, pp. 1720-5.
- [26] Gerard, N.P.; Barnes, P. J. and al., et (1997): *Asthma*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- [27] Kikuchi, Y. and Kaplan, A. P. (2002): A role for C5a in augmenting IgG-dependent histamine release from basophils in chronic urticaria, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 109), No. 1, pp. 114-8.
- [28] Gerard, N. P. and Gerard, C. (1991): The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin, *Nature* (vol. 349), No. 6310, pp. 614-7.
- [29] Gerard, N. P.; Hodges, M. K.; Drazen, J. M.; Weller, P. F. and Gerard, C. (1989): Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils, *J Biol Chem* (vol. 264), No. 3, pp. 1760-6.
- [30] Gasque, P.; Chan, P.; Fontaine, M.; Ischenko, A.; Lamacz, M.; Gotze, O. and Morgan, B. P. (1995): Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes, *J Immunol* (vol. 155), No. 10, pp. 4882-9.
- [31] Braun, M. and Davis, A. E., 3rd (1998): Cultured human glomerular mesangial cells express the C5a receptor, *Kidney Int* (vol. 54), No. 5, pp. 1542-9.
- [32] Drouin, S. M.; Kildsgaard, J.; Haviland, J.; Zabner, J.; Jia, H. P.; McCray, P. B., Jr.; Tack, B. F. and Wetsel, R. A. (2001): Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma, *J Immunol* (vol.

166), No. 3, pp. 2025-32.

- [33] Dempsey, P. W.; Allison, M. E.; Akkaraju, S.; Goodnow, C. C. and Fearon, D. T. (1996): C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity, *Science* (vol. 271), No. 5247, pp. 348-50.
- [34] Karp, C. L.; Grupe, A.; Schadt, E.; Ewart, S. L.; Keane-Moore, M.; Cuomo, P. J.; Kohl, J.; Wahl, L.; Kuperman, D.; Germer, S.; Aud, D.; Peltz, G. and Wills-Karp, M. (2000): Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma, *Nat Immunol* (vol. 1), No. 3, pp. 221-6.
- [35] Krug, N.; Tschernig, T.; Erpenbeck, V. J.; Hohlfeld, J. M. and Kohl, J. (2001): Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 164), No. 10 Pt 1, pp. 1841-3.
- [36] Laudes, I. J.; Chu, J. C.; Huber-Lang, M.; Guo, R. F.; Riedemann, N. C.; Sarma, J. V.; Mahdi, F.; Murphy, H. S.; Speyer, C.; Lu, K. T.; Lambris, J. D.; Zetoune, F. S. and Ward, P. A. (2002): Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells, *J Immunol* (vol. 169), No. 10, pp. 5962-70.
- [37] Hopken, U. E.; Lu, B.; Gerard, N. P. and Gerard, C. (1997): Impaired inflammatory responses in the reverse arthus reaction through genetic deletion of the C5a receptor, *J Exp Med* (vol. 186), No. 5, pp. 749-56.
- [38] van der Pouw Kraan, T. C.; Boeijs, L. C.; de Groot, E. R.; Stapel, S. O.; Snijders, A.; Kapsenberg, M. L.; van der Zee, J. S. and Aarden, L. A. (1997): Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma, *J Immunol* (vol. 158), No. 11, pp. 5560-5.
- [39] Gerard, N. P.; Bao, L.; Xiao-Ping, H.; Eddy, R. L., Jr.; Shows, T. B. and Gerard, C. (1993): Human chemotaxis receptor genes cluster at 19q13.3-13.4. Characterization of the human C5a receptor gene, *Biochemistry* (vol.

32), No. 5, pp. 1243-50.

- [40] Bao, L.; Gerard, N. P.; Eddy, R. L., Jr.; Shows, T. B. and Gerard, C. (1992): Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19, *Genomics* (vol. 13), No. 2, pp. 437-40.
- [41] Ober, C.; Cox, N. J.; Abney, M.; Di Rienzo, A.; Lander, E. S.; Changyaleket, B.; Gidley, H.; Kurtz, B.; Lee, J.; Nance, M.; Pettersson, A.; Prescott, J.; Richardson, A.; Schlenker, E.; Summerhill, E.; Willadsen, S. and Parry, R. (1998): Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma, *Hum Mol Genet* (vol. 7), No. 9, pp. 1393-8.
- [42] Ober, C.; Tsalenko, A.; Parry, R. and Cox, N. J. (2000): A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population, *Am J Hum Genet* (vol. 67), No. 5, pp. 1154-62.
- [43] (1997): A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA), *Nat Genet* (vol. 15), No. 4, pp. 389-92.
- [44] Dizier, M. H.; Besse-Schmittler, C.; Guilloud-Bataille, M.; Annesi-Maesano, I.; Boussaha, M.; Bousquet, J.; Charpin, D.; Degioanni, A.; Gormand, F.; Grimfeld, A.; Hochez, J.; Hyne, G.; Lockhart, A.; Luillier-Lacombe, M.; Matran, R.; Meunier, F.; Neukirch, F.; Pacheco, Y.; Parent, V.; Paty, E.; Pin, I.; Pison, C.; Scheinmann, P.; Thobie, N.; Vervloet, D. and Kauffmann, F. (2000): Genome screen for asthma and related phenotypes in the french EGEA study, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 162), No. 5, pp. 1812-8.
- [45] Loiselle, J. and Wollin, A. (1993): Mucosal histamine elimination and its effect on acid secretion in rabbit gastric mucosa, *Gastroenterology* (vol. 104), No. 4, pp. 1013-20.
- [46] Schwartz, J. C.; Arrang, J. M.; Garbarg, M.; Pollard, H. and Ruat, M.

- (1991): Histaminergic transmission in the mammalian brain, *Physiol Rev* (vol. 71), No. 1, pp. 1-51.
- [47] Okinaga, S.; Ohrai, T.; Nakazawa, H.; Yamauchi, K.; Sakurai, E.; Watanabe, T.; Sekizawa, K. and Sasaki, H. (1995): The role of HMT (histamine N-methyltransferase) in airways: a review, *Methods Find Exp Clin Pharmacol* (vol. 17), No. Suppl C, pp. 16-20.
- [48] Preuss, C. V.; Wood, T. C.; Szumlanski, C. L.; Raftogianis, R. B.; Otterness, D. M.; Girard, B.; Scott, M. C. and Weinshilboum, R. M. (1998): Human histamine N-methyltransferase pharmacogenetics: common genetic polymorphisms that alter activity, *Mol Pharmacol* (vol. 53), No. 4, pp. 708-17.
- [49] Yan, L.; Galinsky, R. E.; Bernstein, J. A.; Liggett, S. B. and Weinshilboum, R. M. (2000): Histamine N-methyltransferase pharmacogenetics: association of a common functional polymorphism with asthma, *Pharmacogenetics* (vol. 10), No. 3, pp. 261-6.
- [50] Walker, C. and Virchow, J. C., Jr. (1993): T-cells and endothelial cells in asthma, *Allergy* (vol. 48), No. 17 Suppl, pp. 24-31; discussion 48-9.
- [51] Holgate, S. T.; Hardy, C.; Robinson, C.; Agius, R. M. and Howarth, P. H. (1986): The mast cell as a primary effector cell in the pathogenesis of asthma, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 77), No. 2, pp. 274-82.
- [52] Dunnill, M. S.; Massarella, G. R. and Anderson, J. A. (1969): A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema, *Thorax* (vol. 24), No. 2, pp. 176-9.
- [53] Takizawa, T. and Thurlbeck, W. M. (1971): Muscle and mucous gland size in the major bronchi of patients with chronic bronchitis, asthma, and asthmatic bronchitis, *Am Rev Respir Dis* (vol. 104), No. 3, pp. 331-6.
- [54] Hogg, J. C. (1987): Varieties of airway narrowing in severe and fatal asthma, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 80), No. 3 Pt 2, pp. 417-9.

- [55] Brogan, T. D.; Ryley, H. C.; Allen, L. and Hutt, H. (1971): Relation between sputum sol phase composition and diagnosis in chronic chest diseases, *Thorax* (vol. 26), No. 4, pp. 418-23.
- [56] Casale, T. B.; Wood, D.; Richerson, H. B.; Zehr, B.; Zavala, D. and Hunninghake, G. W. (1987): Direct evidence of a role for mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction, *J Clin Invest* (vol. 80), No. 5, pp. 1507-11.
- [57] Leung, D. Y. and Bieber, T. (2003): Atopic dermatitis, *Lancet* (vol. 361), No. 9352, pp. 151-60.
- [58] (1998): Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee, *Lancet* (vol. 351), No. 9111, pp. 1225-32.
- [59] Taylor, B.; Wadsworth, J.; Wadsworth, M. and Peckham, C. (1984): Changes in the reported prevalence of childhood eczema since the 1939-45 war, *Lancet* (vol. 2), No. 8414, pp. 1255-7.
- [60] Schafer, T.; Vieluf, D.; Behrendt, H.; Kramer, U. and Ring, J. (1996): Atopic eczema and other manifestations of atopy: results of a study in East and West Germany, *Allergy* (vol. 51), No. 8, pp. 532-9.
- [61] Schultz Larsen, F.; Diepgen, T. and Svensson, A. (1996): The occurrence of atopic dermatitis in north Europe: an international questionnaire study, *J Am Acad Dermatol* (vol. 34), No. 5 Pt 1, pp. 760-4.
- [62] Leung, D. Y.; Bhan, A. K.; Schneeberger, E. E. and Geha, R. S. (1983): Characterization of the mononuclear cell infiltrate in atopic dermatitis using monoclonal antibodies, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 71), No. 1 Pt 1, pp. 47-56.
- [63] Hamid, Q.; Naseer, T.; Minshall, E. M.; Song, Y. L.; Boguniewicz, M. and Leung, D. Y. (1996): In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 98), No. 1, pp. 225-31.

- [64] Grewe, M.; Bruijnzeel-Koomen, C. A.; Schopf, E.; Thepen, T.; Langeveld-Wildschut, A. G.; Ruzicka, T. and Krutmann, J. (1998): A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis, *Immunol Today* (vol. 19), No. 8, pp. 359-61.
- [65] Langeveld-Wildschut, E. G.; Riedl, H.; Thepen, T.; Bihari, I. C.; Bruijnzeel, P. L. and Bruijnzeel-Koomen, C. A. (2000): Modulation of the atopy patch test reaction by topical corticosteroids and tar, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 106), No. 4, pp. 737-43.
- [66] Nickoloff, B. J. and Naidu, Y. (1994): Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin, *J Am Acad Dermatol* (vol. 30), No. 4, pp. 535-46.
- [67] Skoner, D. P. (2001): Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 108), No. 1 Suppl, pp. S2-8.
- [68] Meltzer, E. O. (1997): The prevalence and medical and economic impact of allergic rhinitis in the United States, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 99), No. 6 Pt 2, pp. S805-28.
- [69] Wright, A. L.; Holberg, C. J.; Martinez, F. D.; Halonen, M.; Morgan, W. and Taussig, L. M. (1994): Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood, *Pediatrics* (vol. 94), No. 6 Pt 1, pp. 895-901.
- [70] Rimpela, A. H.; Savonius, B.; Rimpela, M. K. and Haahtela, T. (1995): Asthma and allergic rhinitis among Finnish adolescents in 1977-1991, *Scand J Soc Med* (vol. 23), No. 1, pp. 60-5.
- [71] Asher, M. I.; Keil, U.; Anderson, H. R.; Beasley, R.; Crane, J.; Martinez, F.; Mitchell, E. A.; Pearce, N.; Sibbald, B.; Stewart, A. W. and et al. (1995): International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods, *Eur Respir J* (vol. 8), No. 3, pp. 483-91.
- [72] Barnes, K. C.; Fernandez-Caldas, E.; Trudeau, W. L.; Milne, D. E. and Brenner, R. J. (1997): Spatial and temporal distribution of house dust mite (*Astigmata:Pyroglyphidae*) allergens Der p 1 and Der f 1 in Barbadian

homes, *J Med Entomol* (vol. 34), No. 2, pp. 212-8.

- [73] Platt-Mills, T. A.; Sporik, R. B.; Chapman, M. D. and Heymann, P. W. (1995): The role of indoor allergens in asthma, *Allergy* (vol. 50), No. 22 Suppl, pp. 5-12.
- [74] Devlin, B. and Risch, N. (1995): A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping, *Genomics* (vol. 29), No. 2, pp. 311-22.
- [75] Liu, X.; Beaty, T. H.; Deindl, P.; Huang, S. K.; Lau, S.; Sommerfeld, C.; Fallin, M. D.; Kao, W. H.; Wahn, U. and Nickel, R. (2003): Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 112), No. 2, pp. 382-8.
- [76] Schaid, D. J. and Rowland, C. M. (1999): Quantitative trait transmission disequilibrium test: allowance for missing parents, *Genet Epidemiol* (vol. 17), No. Suppl 1, pp. S307-12.
- [77] Wjst, M.; Heinrich, J.; Liu, P.; Dold, S.; Wassmer, G.; Merkel, G.; Huelssse, C. and Wichmann, H. E. (1994): Indoor factors and IgE levels in children, *Allergy* (vol. 49), No. 9, pp. 766-71.
- [78] Atici, A.; Guneser, S.; Alparslan, N.; Antmen, B.; Yilmaz, M. and Onenli, N. (1994): Influence of smoke exposure on serum IgE levels of atopic patients, *Acta Paediatr Jpn* (vol. 36), No. 3, pp. 266-7.
- [79] Kjellman, N. I. (1981): Effect of parental smoking on IgE levels in children, *Lancet* (vol. 1), No. 8227, pp. 993-4.
- [80] Postma, D. S.; Bleecker, E. R.; Amelung, P. J.; Holroyd, K. J.; Xu, J.; Panhuysen, C. I.; Meyers, D. A. and Levitt, R. C. (1995): Genetic susceptibility to asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy, *N Engl J Med* (vol. 333), No. 14, pp. 894-900.
- [81] Beyer, K.; Nickel, R.; Freidhoff, L.; Bjorksten, B.; Huang, S. K.; Barnes, K. C.; MacDonald, S.; Forster, J.; Zepp, F.; Wahn, V.; Beaty, T. H.; Marsh, D.

- G. and Wahn, U. (2000): Communications: association and linkage of atopic dermatitis with chromosome 13q12-14 and 5q31-33 markers, *J Invest Dermatol* (vol. 115), No. 5, pp. 906-8.
- [82] Meyers, D. A.; Postma, D. S.; Panhuysen, C. I.; Xu, J.; Amelung, P. J.; Levitt, R. C. and Bleeker, E. R. (1994): Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5, *Genomics* (vol. 23), No. 2, pp. 464-70.
- [83] Grunig, G.; Warnock, M.; Wakil, A. E.; Venkayya, R.; Brombacher, F.; Rennick, D. M.; Sheppard, D.; Mohrs, M.; Donaldson, D. D.; Locksley, R. M. and Corry, D. B. (1998): Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma, *Science* (vol. 282), No. 5397, pp. 2261-3.
- [84] Wills-Karp, M.; Luyimbazi, J.; Xu, X.; Schofield, B.; Neben, T. Y.; Karp, C. L. and Donaldson, D. D. (1998): Interleukin-13: central mediator of allergic asthma, *Science* (vol. 282), No. 5397, pp. 2258-61.
- [85] Coyle, A. J.; Le Gros, G.; Bertrand, C.; Tsuyuki, S.; Heusser, C. H.; Kopf, M. and Anderson, G. P. (1995): Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity, *Am J Respir Cell Mol Biol* (vol. 13), No. 1, pp. 54-9.
- [86] Weiland, S. K.; von Mutius, E.; Hirsch, T.; Duhme, H.; Fritzsche, C.; Werner, B.; Husing, A.; Stender, M.; Renz, H.; Leupold, W. and Keil, U. (1999): Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification, *Eur Respir J* (vol. 14), No. 4, pp. 862-70.
- [87] Taussig, L. M.; Wright, A. L.; Morgan, W. J.; Harrison, H. R. and Ray, C. G. (1989): The Tucson Children's Respiratory Study. I. Design and implementation of a prospective study of acute and chronic respiratory illness in children, *Am J Epidemiol* (vol. 129), No. 6, pp. 1219-31.
- [88] Zhu, Z.; Homer, R. J.; Wang, Z.; Chen, Q.; Geba, G. P.; Wang, J.; Zhang, Y. and Elias, J. A. (1999): Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic

abnormalities, and eotaxin production, *J Clin Invest* (vol. 103), No. 6, pp. 779-88.

- [89] van der Pouw Kraan, T. C.; van Veen, A.; Boeijs, L. C.; van Tuyl, S. A.; de Groot, E. R.; Stapel, S. O.; Bakker, A.; Verweij, C. L.; Aarden, L. A. and van der Zee, J. S. (1999): An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma, *Genes Immun* (vol. 1), No. 1, pp. 61-5.
- [90] Howard, T. D.; Whittaker, P. A.; Zaiman, A. L.; Koppelman, G. H.; Xu, J.; Hanley, M. T.; Meyers, D. A.; Postma, D. S. and Bleecker, E. R. (2001): Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population, *Am J Respir Cell Mol Biol* (vol. 25), No. 3, pp. 377-84.
- [91] Noguchi, E.; Shibasaki, M.; Arinami, T.; Takeda, K.; Yokouchi, Y.; Kawashima, T.; Yanagi, H.; Matsui, A. and Hamaguchi, H. (1998): Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese, *Clin Exp Allergy* (vol. 28), No. 4, pp. 449-53.
- [92] Burchard, E. G.; Silverman, E. K.; Rosenwasser, L. J.; Borish, L.; Yandava, C.; Pillari, A.; Weiss, S. T.; Hasday, J.; Lilly, C. M.; Ford, J. G. and Drazen, J. M. (1999): Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 160), No. 3, pp. 919-22.
- [93] Walley, A. J. and Cookson, W. O. (1996): Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy, *J Med Genet* (vol. 33), No. 8, pp. 689-92.
- [94] Sandford, A. J.; Chagani, T.; Zhu, S.; Weir, T. D.; Bai, T. R.; Spinelli, J. J.; Fitzgerald, J. M.; Behbehani, N. A.; Tan, W. C. and Pare, P. D. (2000): Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 106), No. 1 Pt 1, pp. 135-40.
- [95] Kruse, S.; Japha, T.; Tedner, M.; Sparholt, S. H.; Forster, J.; Kuehr, J. and Deichmann, K. A. (1999): The polymorphisms S503P and Q576R in the

- interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction, *Immunology* (vol. 96), No. 3, pp. 365-71.
- [96] Risma, K. A.; Wang, N.; Andrews, R. P.; Cunningham, C. M.; Ericksen, M. B.; Bernstein, J. A.; Chakraborty, R. and Hershey, G. K. (2002): V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function, *J Immunol* (vol. 169), No. 3, pp. 1604-10.
- [97] Kauppi, P.; Lindblad-Toh, K.; Sevon, P.; Toivonen, H. T.; Rioux, J. D.; Villapakkam, A.; Laitinen, L. A.; Hudson, T. J.; Kere, J. and Laitinen, T. (2001): A second-generation association study of the 5q31 cytokine gene cluster and the interleukin-4 receptor in asthma, *Genomics* (vol. 77), No. 1-2, pp. 35-42.
- [98] Mitsuyasu, H.; Yanagihara, Y.; Mao, X. Q.; Gao, P. S.; Arinobu, Y.; Ihara, K.; Takabayashi, A.; Hara, T.; Enomoto, T.; Sasaki, S.; Kawai, M.; Hamasaki, N.; Shirakawa, T.; Hopkin, J. M. and Izuhara, K. (1999): Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis, *J Immunol* (vol. 162), No. 3, pp. 1227-31.
- [99] Noguchi, E.; Shibasaki, M.; Arinami, T.; Takeda, K.; Yokouchi, Y.; Kobayashi, K.; Imoto, N.; Nakahara, S.; Matsui, A. and Hamaguchi, H. (1999): Lack of association of atopy/asthma and the interleukin-4 receptor alpha gene in Japanese, *Clin Exp Allergy* (vol. 29), No. 2, pp. 228-33.
- [100] Gao, P. S.; Mao, X. Q.; Hopkin, J. M.; Adra, C. N.; Yang, X. and Shirakawa, T. (2000): Functional significance of polymorphisms of the interleukin-4 and interleukin-13 receptors in allergic disease, *Clin Exp Allergy* (vol. 30), No. 12, pp. 1672-5.
- [101] Noguchi, E.; Shibasaki, M.; Arinami, T.; Takeda, K.; Yokouchi, Y.; Kobayashi, K.; Imoto, N.; Nakahara, S.; Matsui, A. and Hamaguchi, H. (1999): No association between atopy/asthma and the IL50Val polymorphism of IL-4 receptor, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 160), No. 1, pp. 342-5.
- [102] Laing, I. A.; Goldblatt, J.; Eber, E.; Hayden, C. M.; Rye, P. J.; Gibson, N.

- A.; Palmer, L. J.; Burton, P. R. and Le Souef, P. N. (1998): A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma, *J Med Genet* (vol. 35), No. 6, pp. 463-7.
- [103] Le Souef, P. N.; Goldblatt, J. and Lynch, N. R. (2000): Evolutionary adaptation of inflammatory immune responses in human beings, *Lancet* (vol. 356), No. 9225, pp. 242-4.
- [104] Martinson, J. J.; Chapman, N. H.; Rees, D. C.; Liu, Y. T. and Clegg, J. B. (1997): Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion, *Nat Genet* (vol. 16), No. 1, pp. 100-3.
- [105] Nickel, R. G.; Casolaro, V.; Wahn, U.; Beyer, K.; Barnes, K. C.; Plunkett, B. S.; Freidhoff, L. R.; Sengler, C.; Plitt, J. R.; Schleimer, R. P.; Caraballo, L.; Naidu, R. P.; Levett, P. N.; Beaty, T. H. and Huang, S. K. (2000): Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES, *J Immunol* (vol. 164), No. 3, pp. 1612-6.
- [106] Nickel, R. G.; Willadsen, S. A.; Freidhoff, L. R.; Huang, S. K.; Caraballo, L.; Naidu, R. P.; Levett, P.; Blumenthal, M.; Banks-Schlegel, S.; Bleecker, E.; Beaty, T.; Ober, C. and Barnes, K. C. (1999): Determination of Duffy genotypes in three populations of African descent using PCR and sequence-specific oligonucleotides, *Hum Immunol* (vol. 60), No. 8, pp. 738-42.
- [107] Gold, D. R.; Wypij, D.; Wang, X.; Speizer, F. E.; Pugh, M.; Ware, J. H.; Ferris, B. G., Jr. and Dockery, D. W. (1994): Gender- and race-specific effects of asthma and wheeze on level and growth of lung function in children in six U.S. cities, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 149), No. 5, pp. 1198-208.
- [108] Sherman, C. B.; Tollerud, D. J.; Heffner, L. J.; Speizer, F. E. and Weiss, S. T. (1993): Airway responsiveness in young black and white women, *Am Rev Respir Dis* (vol. 148), No. 1, pp. 98-102.
- [109] Lester, L. A.; Rich, S. S.; Blumenthal, M. N.; Togias, A.; Murphy, S.; Malveaux, F.; Miller, M. E.; Dunston, G. M.; Solway, J.; Wolf, R. L.; Samet,

J. M.; Marsh, D. G.; Meyers, D. A.; Ober, C. and Bleecker, E. R.
(2001): Ethnic differences in asthma and associated phenotypes:
collaborative study on the genetics of asthma, J Allergy Clin Immunol (vol.
108), No. 3, pp. 357-62.

Danksagung

Meine Eltern förderten mich während meines Studiums und haben damit diese Arbeit erst ermöglicht.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Wahn möchte ich für die Vergabe des Dissertationsthemas danken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Renate Nickel für das in mich gesetzte Vertrauen und die intensive Betreuung. In ihrem Team habe ich mich stets außerordentlich wohl gefühlt und sie ist mir nicht nur fachlich, sondern auch in menschlicher Hinsicht zum Vorbild geworden.

Dr. Claudia Sengler leitete mich zum wissenschaftlichen Arbeiten an, führte interessante Diskussionen mit mir und half mit zahlreichen kompetenten Ratschlägen. Merra Abera-Lemu, Sebastian Müller und Sebastian Oberreit danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung. Die Arbeit im Labor mit ihnen hat mir immer viel Spaß gemacht.

Gabriele Schulz bestimmte die IgE-Werte und trug entscheidend zur guten Arbeitsatmosphäre im Labor bei. Claudia Güldner unterstützte und beriet mich bei der Durchführung der Versuche. Des Weiteren danke ich allen MAS-Mitarbeitern sowie Margret Oberreit, Petra Ellenson, Theresa Jura, Margarita Strozynski und Petra Wagner.

Liu Xin, Christine Sommerfeld und Sabina Illi ermöglichten die statistische Auswertung der Daten. Olfert Landt von TIB MOLBIOL übernahm das Design der Primer und Sonden und Dr. Heiko Witt half mir bei technischen Fragen am LightCycler. Dr. Kathleen Barnes, Dr. Klaus Deichmann sowie Dr. Andrea Heinzmann danke ich für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Barbados- bzw. der Freiburger Asthma-Population.

Ganz besonderer Dank gebührt den an den Studien teilnehmenden Kindern und Eltern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name	Philipp Deindl
Geburtsort	25.11.1975 Mannheim
Schulbildung	
Grundschule	1982-1986 Leopoldschule in Weil am Rhein
Gymnasium	1986-1995 Kant-Gymnasium in Weil am Rhein
Zivildienst	08.1995 bis 07.1996 Steroidpharmakologie und Neuroprotektion, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Studium	
Biochemie	10.1996 Biochemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen 03.1999 Vordiplom in Biochemie
Medizin	02.1998 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen
Physikum	03.2000
Hochschulwechsel	10.2000 Hochschulwechsel an die Humboldt-Universität Berlin
Erstes Staatsexamen	03.2001
Zweites Staatsexamen	09.2003
Drittes Staatsexamen	12.2004
Dissertation	03.2001 Forschungsstipendium der Charité bei Prof. Dr. U. Wahn, Klinik für Pädiatrie Humboldt-Universität Berlin
Klinische Ausbildung	
Pflegepraktikum	07.1999 Herz-, Thorax-, Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen
Famulaturen	07.2000 Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen 03.2002 Innere Medizin, Sanitätsbetrieb Brixen, Italien 07.2002 Neonatologie, Helios-Klinikum Buch, Berlin 03.2003 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Kloesel, Berlin
Praktisches Jahr	Innere Medizin, Université de la Méditerranée Aix-Marseille, Hopital de la Timone, Frankreich Chirurgie, University of Sydney, Concord Hospital, Australien Chirurgie, University of Queensland, Princess-Alexandra-Hospital, Brisbane, Australien Neonatologie und Allgemeinpädiatrie, Charité, Campus Virchow, Berlin

Berlin, im Januar 2005

Eidesstattliche Erklärung

hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 23. August 2004

Philipp Deindl